



Universitat Autònoma de Barcelona

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
de la Facultad de Veterinaria**

Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG)

**ANÁLISIS EN ANIMALES TRANSGÉNICOS DEL
PAPEL DEL INCREMENTO EN LA
GLICERONEOGÉNESIS O EN LA CAPTACIÓN
DE GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSO**

SERGIO ANTONIO MUÑOZ FORERO

Memoria presentada por el licenciado SERGIO ANTONIO MUÑOZ FORERO para optar al grado de Doctor en Bioquímica.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert y la Dra. Sylvie Franckhauser en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria y en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG).

SERGIO ANTONIO MUÑOZ FORERO

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

SYLVIE FRANCKHAUSER

Abril de 2006

Bellaterra

"Si quieres hallar en cualquier parte amistad, amor y felicidad, llévalas siempre contigo" (adaptado de *George Duhamel*)

ABREVIATURAS

18S	Subunidad ribosómica 18S
28S	Subunidad ribosómica 28S
2-DG	2-deoxiglucosa
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
aP2	Proteína intracelular de unión a lípidos específica del adipocito
aP2-GK	Ratón transgénico que expresa GK en tejido adiposo
aP2-PEPCK	Ratón transgénico que sobreexpresa PEPCK en tejido adiposo
ATP	Adenosina trifosfato
BAT	Tejido adiposo marrón
BMI	Índice de masa corporal
BSA	Albúmina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
cDNA	DNA complementario sintetizado utilizando RNA como molde
Ci	Curio
cpm	cuentas por minuto
Cts	Número de ciclo en que se produce el incremento significativo de la fluorescencia en PCR a tiempo real(threshold cycle)
C/EBPs	Proteínas inductoras de la transcripción que se unen a la secuencia CCAAT
C/EBPα	Factor de transcripción alfa que se une a la secuencia CCAAT
C/EBPβ	Factor de transcripción beta que se une a la secuencia CCAAT
C/EBPδ	Factor de transcripción delta que se une a la secuencia CCAAT
C/EBPζ	Factor de transcripción zeta que se une a la secuencia CCAAT
dCTP	deoxicitidina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol

EDTA	Etilendiaminotetraacetato
EGTA	Ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima ("enzyme-linked immunosorbent assay")
FADH₂	Forma reducida del dinucleótido de adenina
FFAs	Ácidos grasos libres
F1P	Fructosa-1-fosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
Glicerol-3-P	Glicerol-3-fosfato
GK	Glucoquinasa
GKRP	Proteína reguladora de la glucoquinasa
GLUTs	Transportadores de azúcares independientes de sodio
GLUT4	Transportador de glucosa estimulado por la insulina
G6P	Glucosa-6-fosfato
G-6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
HFD	Dieta alta en lípidos
HK	Hexoquinasas
HSL	Lipasa sensible a hormonas
H⁺	Protones
IDP	Inosin difosfato
IL6	Interleuquina-6
kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
LB	Medio Luria-Bertrani
M	Molar
mA	miliAmperios
MDH	Malato deshidrogenasa
mM	miliMolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NA	Noradrenalina
NADH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida

nm	nanómetros
oligo-dT	Oligo deoxitimina
pb	pares de bases
PC	Piruvato carboxilasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PEPCK-C	Forma citosólica de la PEPCK
PEPCK-M	Forma mitocondrial de la PEPCK
PFK/FBPasa	6-fosfofructo-2-quinasa/ fructosa-2,6-bifosfatasa
PG	Prostaglandinas
PGC-1α	Coactivador-1 alfa del PPAR γ
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PPARs	Familia de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas
PPARα	Receptor alfa activado por proliferadores de peroxisomas
PPARδ	Receptor delta activados por proliferadores de peroxisomas
PPARγ	Receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas
ppm	partes por millón
P-enolpiruvato	Fosfoenolpiruvato
RIA	Radioinmunoensayo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RXR	Receptores X para retinoides
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Gel de SDS y poliacrilamida para electroforesis
SE	Error estándar
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Parasimpático
SNS	Sistema Nervioso Simpático
SRC-1	Coactivador-1 del receptor activado por esteroides
SREBPs	Familia de proteínas de unión a elementos que responden a esteroides

SREBP-1a	Factor-1a de unión a elementos que responde a esteroides
SREBP-1c	Factor-1c de unión a elementos que responde a esteroides
SSC	Citrato sódico salino
SV40	Virus simio 40
TAE	Tampón tris-acetato-EDTA
Tg	Ratón transgénico
TIF2	Factor transcripcional intermediario-2
TNF-α	Factor alfa de necrosis tumoral
TZDs	Tiazolidinedionas
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UCP1	Proteína desacopladora 1
WAT	Tejido adiposo blanco

AGRADECIMIENTOS

Tras un largo y arduo camino, repleto de experimentos y resultados, de alegrías y de tristezas, se hace difícil resumir todo el agradecimiento que siento a todos los que han hecho posible mi embarque en el navío de la ciencia y el discurrir por sus mares hasta alcanzar el puerto donde ahora concluyo. No quisiera olvidarme de ninguno, si fuera así, perdonadme...

En primer lugar, agradezco a la Dra. Fàtima Bosch la oportunidad que me brindó al aceptarme en su grupo de investigación bajo su dirección y haber supervisado mi trabajo durante todos estos años. Le agradezco su entusiasmo y capacidad de trabajo casi incansable.

Especialmente agradezco a la Dra. Franckhauser la codirección de esta Tesis Doctoral y todo el trabajo realizado conjuntamente... Diga lo que diga, poco representará lo que tanto te debo y agradezco, Sylvie. Muchísimas gracias. Desde el primer día al último he crecido científica y personalmente, y mucho de ello te lo debo a ti. Sólo espero que, aunque sea un poquito, estés orgullosa...

Doy las gracias muy especialmente al reciente Dr. Antonio Hidalgo por toda su ayuda y su amistad. Hemos madurado juntos, tanto en la ciencia como en la vida. Para tu suerte o desgracia, difícilmente te librarás de mi, amigo...

Muchos han contribuido con su granito de arena en esta larga travesía... Desde la ayuda indispensable en un laboratorio de experimentación animal a las conversaciones científico-humanas, pasando por el día a día de las relaciones laborales y personales... a todos y a todas, muchas gracias por vuestra ayuda, presencia, cariño y apoyo. Gracias a los "veteranos" que han viajado conmigo desde mis inicios compartiendo mucho: Miquel García, Edu, Joel, Xavi,... A Carles Ros por guiar mis primeros pasos en el laboratorio, al Dr. Pedro Otaegui por su "avisados quedáis" y a las nuevas técnicas: Jennifer y Lidia... A la unidad al completo de la UAT: Anna Pujol, Anna Arbòs y Ainara, por su simpatía y buen hacer... A mi club femenino de fans que tanto me han cuidado y a las que tanto he cuidado y cuidaré: Alba, Ariana, Sylvie, Marta, Mireia, Virginia, Tura, Judith, Ivet y las nuevas incorporaciones: María Molas, Gloria, Vero y Pilar... A esos grandes compañeros que, además de echarme una mano, cada día me ayudan a sonreír, Charly y Albert... A los nuevos, alguno ya talludito:

David, Albert Ribera, Gor y Chris Mann... A los que ya no están pero que antes estuvieron: Alex, María, Efrén, Gemma, Mónica, Marisa, Estefanía... A todo el personal del estabulario de la UAB, especialmente a Rafi, Juanjo y Matías que tanto me facilitaron el trabajo con los ratones, y al personal del nuevo estabulario SPF por el mantenimiento y el trabajo con mis actuales animales.

Con el traslado al nuevo centro, no quisiera olvidarme de dar las gracias a todos los que dejé allí... Especialmente doy las gracias a la Dra. Anna Bassols por presentarme por primera vez el mundo científico y un laboratorio de Bioquímica Clínica... También a Yolanda Saco por enseñarme que era un autoanalizador y un proteinograma, a Mercè per la seva gentilesa amb un gran somriure... Al Dr. Joaquim Ariño por su trato cordial y permitirme "ser uno de los suyos" las veces que entré a su laboratorio, a la Dra. Barceló por su amabilidad... Gràcies al peculiar i únic Dr. Néstor Gómez per les llargues hores i els anticossos secundaris de última hora... A los compadres del V0-181, V0-177 y V0-175, tanto los que están como los que estuvieron, por convertir el pasillo de Bioquímica de Veterinaria en el de mejor ambiente laboral y personal, además de uno de los más productivos, de ello estoy seguro... A la meva molt apreciada Anna Vilalta per ser la gran mare de tots els que hem estat a Bioquímica de Veterinària i compartir "vivències" amb els autoanalitzadors... Gracias a todo el personal de administración, tanto el del Departamento de Bioquímica de Veterinaria como el del CBATEG, que siempre me ha facilitado el papeleo: Carmen, Rosa, Silvia, Montse, Espe, Esther, Lluís, Sara, Teresa...Al personal de seguridad de la UAB, por las veces que hemos coincidido, especialmente en los inicios...

Finalmente, aunque el mayor agradecimiento de todos, doy las gracias a mi numerosa familia, muy especialmente a mis padres y a mi hermano y cuñada, por todo el apoyo, sacrificios, ayuda, comprensión y cariño necesarios para alcanzar, no sólo este puerto de la vida sino cualquiera al que quisiera, ayer, hoy y siempre... ¡¡Muchísimas gracias!!

El trabajo de todo este tiempo se ha realizado gracias, en primer lugar, a la beca predoctoral de la Direcció General d'Universitats de la Generalitat de Catalunya, de la que he sido beneficiario durante mis primeros cuatro años. Las investigaciones han sido financiadas por el Plan Nacional de I+D+I (SAF2005-01262 y GEN2001-4758-C07-02), el Instituto de Salud Carlos III (FIS 01/0427, Red de Centros Metabolismo y Nutrición C03/08 y Red de Grupos Diabetes Mellitus G03/212), la Fundació La Marató de TV3 (992710) y la Comunidad Europea (FP6 EUGENE2 [LSHM-CT-2004-512013]). Gracias al Dr. R.W. Hanson

(Case Western Reserve University, Cleveland, USA) por el gen de la PEPCK, al Dr. B.M. Spiegelman (Harvard Medical School, Boston, USA) por el promotor *aP2* y los cDNAs de PPAR γ y PGC-1 α , al Dr. P.B. Iynedjian (University of Geneva, Geneva, Switzerland) por el cDNA de la GK de rata y al Dr. D. Ricquier (Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris, France) por el cDNA de UCP1. Thanks for Dr. Malcolm Watford for helpful discussions. También quiero agradecer especialmente la colaboración y asesoramiento del Dr. Sebastián Cerdán (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, España) en los estudios por Resonancia Magnética Nuclear.

ÍNDICE

I. PRESENTACIÓN	1-2
II. INTRODUCCIÓN	3-42
1. OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO: un problema de salud mundial	3-8
1.1. OBESIDAD: LA GRAN EPIDEMIA DEL SIGLO XXI.....	3
1.2. OBESIDAD, SÍNDROME METABÓLICO Y DIABETES DE TIPO 2.....	4-7
1.2.1. Obesidad.....	4
1.2.2. Síndrome Metabólico.....	4-5
1.2.3. Diabetes mellitus de tipo 2.....	5-7
1.3. DEFINICIÓN DE SOBREPESO Y DE OBESIDAD.....	7-8
1.4. TIPOS DE OBESIDAD HUMANA.....	8
2. EL TEJIDO ADIPOSO	9-34
2.1. ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO.....	9-10
2.2. TIPOS DE ADIPOCITOS MADUROS.....	10-11
2.2.1. Los adipocitos blancos.....	10
2.2.2. Los adipocitos marrones.....	11
2.3. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL TEJIDO ADIPOSO.....	11-12
2.4. EL ÓRGANO ADIPOSO Y LA TRANSDIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO.....	13-14
2.5. CRECIMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO.....	14-19
2.5.1. La familia C/EBPs.....	15-16
2.5.2. La familia PPARs.....	16-18
2.5.3. La familia SREBPs.....	18
2.5.4. Regulación transcripcional de la adipogénesis.....	18-19
2.6. FUNCIONES DEL ÓRGANO ADIPOSO.....	20-34
2.6.1. Función lipogénica del adipocito.....	22-26
2.6.1.1. Producción de glicerol-3-fosfato.....	23-24
2.6.1.2. Reesterificación de ácidos grasos: papel de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.....	24-26
2.6.2. Función lipolítica del adipocito.....	27-28
2.6.3. Función termogénica del adipocito marrón.....	28-30
2.6.3.1. Regulación de la termogénesis en tejido adiposo marrón.....	30
2.6.4. Función secretora del adipocito blanco y marrón.....	31-34

2.6.4.1. Leptina.....	31-33
2.6.4.2. Adiponectina.....	33
2.6.4.3. Factor- α de necrosis tumoral.....	33-34
2.6.4.4. Interleuquina-6.....	34
3. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.....	35-42
3.1. LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA.....	36-37
3.2. LAS HEXOQUINASAS.....	37-42
3.2.1. Las hexoquinasas I-III.....	38
3.2.2. La hexoquinasa IV o glucoquinasa.....	39-42
3.2.2.1. Regulación de la glucoquinasa en hepatocitos.....	40-41
3.2.2.2. Regulación de la glucoquinasa en células β	41-42
III. OBJETIVOS.....	43
IV. RESULTADOS.....	44-107
PARTE I: EFECTO DEL INCREMENTO DE LA GLICERONEOGÉNESIS EN TEJIDO ADIPOSO EN EL DESARROLLO DE OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA.....	44-80
1.1. OBTENCIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESEN PEPCK EN TEJIDO ADIPOSO.....	44-49
1.1.1. Construcción del gen quimérico aP2-PEPCK.....	44-45
1.1.2. Obtención de los animales transgénicos aP2-PEPCK.....	46-47
1.1.3. Análisis de la expresión del transgen aP2-PEPCK.....	47-48
1.1.4. Determinación de la actividad enzimática PEPCK en el tejido adiposo.....	49
1.2. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN TEJIDO ADIPOSO CAUSADAS POR LA SOBREENPRESIÓN DE PEPCK EN DICHO TEJIDO.....	50-54
1.2.1. Análisis del peso corporal, del peso del tejido adiposo y del contenido de grasa corporal.....	50-52
1.2.2. Estudio histológico del tejido adiposo.....	52-53
1.2.3. Determinación de la gliceroneogénesis y de la reesterificación de ácidos grasos libres.....	54
1.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS SISTÉMICOS PROVOCADOS POR LA SOBREENPRESIÓN DE PEPCK EN TEJIDO ADIPOSO.....	55-61
1.3.1. Análisis de la glucemia e insulinemia.....	55

1.3.2. Test de tolerancia a la glucosa.....	56-57
1.3.3. Test de tolerancia a la insulina.....	56-57
1.3.4. Utilización de glucosa <i>in vivo</i> por el músculo esquelético.....	57-58
1.3.5. Determinación de otros metabolitos sanguíneos y hormonas circulantes.....	58-61
1.3.5.1. Triglicéridos y lactato séricos.....	59
1.3.5.2. Ácidos grasos libres y glicerol séricos.....	59-60
1.3.5.3. Determinación de leptina y de TNF- α	61
1.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN LÍPIDOS EN LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS aP2-PEPCK.....	62-80
1.4.1. Efecto de la dieta alta en lípidos sobre el peso corporal.....	62-63
1.4.2. Efecto del consumo de la dieta HFD sobre el tejido adiposo blanco.....	63-66
1.4.2.1. Análisis del peso del tejido adiposo blanco epididimal y expresión de PEPCK tras una dieta HFD.....	64-65
1.4.2.2. Análisis histológico del tejido adiposo blanco epididimal tras una dieta alta en lípidos.....	65-66
1.4.3. Estudio de los efectos sistémicos de la dieta alta en lípidos en los animales transgénicos aP2-PEPCK.....	67-72
1.4.3.1. Determinación de la glucemia e insulinemia.....	67-68
1.4.3.2. Test intraperitoneal de tolerancia a la insulina.....	68-69
1.4.3.3. Test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa.....	69
1.4.3.4. Determinación de los niveles circulantes de triglicéridos y ácidos grasos libres.....	70-71
1.4.3.5. Determinación de los niveles circulantes de adipocitoquinas.....	72-73
1.4.4. Estudio de los efectos de la dieta diabotogénica a nivel hepático en los animales transgénicos aP2-PEPCK.....	73-75
1.4.4.1. Análisis histológicos del hígado de animales en dieta alta en lípidos.....	74
1.4.4.2. Contenido de triglicéridos en el hígado.....	75
1.4.5. Estudio de los efectos de la dieta alta en lípidos a nivel del tejido adiposo marrón en animales transgénicos aP2-PEPCK.....	76-80
1.4.5.1. Análisis histológicos del BAT de animales tras la dieta alta en lípidos.....	76-77
1.4.5.2. Análisis de la expresión génica en BAT.....	77-78
1.4.5.3. Análisis del nivel de proteínas en BAT.....	78-80

PARTE II: EFECTO DEL INCREMENTO EN LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSO EN LA PRODUCCIÓN DE GLICEROL-3-FOSFATO, OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA.....	81-107
2.1. OBTENCIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESEN GLUCOQUINASA EN TEJIDO ADIPOSO.....	81-86
2.1.1. Construcción del gen quimérico aP2-GK.....	81-82
2.1.2. Obtención y genotipado de los animales transgénicos aP2-GK.....	83-84
2.1.3. Análisis de la expresión del transgen aP2-GK.....	85
2.1.4. Determinación de la presencia de glucoquinasa en tejido adiposo blanco.....	86
2.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE GK EN TEJIDO ADIPOSO....	87-95
2.2.1. Utilización basal de glucosa <i>in vivo</i> por el tejido adiposo blanco y músculo esquelético.....	87
2.2.2. Análisis del peso corporal, peso del tejido adiposo epididimal y contenido de grasa corporal.....	88
2.2.3. Estudio histológico del tejido adiposo blanco.....	88-89
2.2.4. Determinación de la producción de glicerol-3-P y síntesis <i>de novo</i> de lípidos a partir de la glucosa.....	90
2.2.5. Estudios por resonancia magnética nuclear del destino de la glucosa en WAT.....	91-93
2.2.6. Consumo de glucosa y producción de lactato <i>in vitro</i> por el tejido adiposo blanco epididimal.....	94-95
2.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS SISTÉMICOS DE LA EXPRESIÓN DE GK EN TEJIDO ADIPOSO.....	96-100
2.3.1. Determinación de los niveles circulantes de lactato.....	96
2.3.2. Test de tolerancia a la glucosa.....	97
2.3.3. Test de tolerancia a la insulina.....	98
2.3.4. Análisis de los metabolitos sanguíneos.....	99
2.3.5. Determinación de los niveles circulantes de hormonas.....	100
2.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE ANIMALES TRANSGÉNICOS.....	101-106
2.4.1. Cambios en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa.....	101-102

2.4.2. Cambios en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos.....	103-104
2.4.3. Cambios en la expresión de genes involucrados en el metabolismo mitocondrial.....	104-106
2.5. ESTUDIO DEL METABOLISMO HEPÁTICO DE ANIMALES TRANSGÉNICOS aP2-GK.....	106-107
V. DISCUSIÓN.....	108-119
VI. CONCLUSIONES.....	120-121
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	122-159
1. MATERIALES.....	122-126
1.1. ANIMALES.....	122-123
1.1.1. Obtención de ratones transgénicos y el establecimiento de sus líneas.....	122-123
1.2. CEPAS BACTERIANAS Y VECTORES PLASMÍDICOS.....	123-124
1.3. SONDAS DE DNA.....	124-125
1.4. ANTICUERPOS.....	125
2. MÉTODOS.....	126-159
2.1. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.....	126-130
2.1.1. Preparación DNA plasmídico.....	126
2.1.2. Enzimas de restricción del DNA.....	127
2.1.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.....	127-128
2.1.3.1. Geles de agarosa.....	127-128
2.1.3.2. Purificación de los fragmentos de DNA.....	128
2.1.4. Construcción de moléculas híbridas de DNA.....	128-129
2.1.4.1. Subclonaje de los fragmentos de DNA.....	128-129
2.1.4.2. Transformación de las células de <i>E. coli</i>	129
2.1.5. Marcaje radioactivo de las sondas de DNA.....	129-130
2.2. DETECCIÓN DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS.....	130-133
2.2.1. Obtención del DNA genómico.....	130
2.2.2. Análisis del DNA mediante Southern blot.....	131-133
2.2.2.1. Digestión y electroforesis del DNA genómico.....	131

2.2.2.2. Transferencia del DNA desde el gel a una membrana.....	131
2.2.2.3. Prehibridación/hibridación de la membrana.....	131-132
2.2.2.4. Lavados de la membrana y revelado.....	132-133
2.3. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA.....	133-135
2.3.1. Extracción del RNA total.....	133
2.3.2. Electroforesis del RNA en geles desnaturalizantes de agarosa/formaldehído.....	134
2.3.3. Análisis del RNA mediante "Northern blot" (hibridación DNA-RNA).....	134-135
2.4. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	135-138
2.4.1. Extracción de proteínas totales.....	135-136
2.4.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	136
2.4.3. Análisis de las proteínas mediante Western-blot.....	137-138
2.4.3.1. Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.....	137
2.4.3.2. Electrotransferencia a membrana e inmunodetección.....	137-138
2.5. TÉCNICAS <i>IN VIVO</i>	138-141
2.5.1. Dieta alta en lípidos.....	138
2.5.2. Determinación del consumo de alimento.....	139
2.5.3. Test de tolerancia la glucosa.....	139
2.5.4. Test de tolerancia a la insulina.....	139-140
2.5.5. Determinación del índice de utilización de la glucosa.....	140-141
2.6. TÉCNICAS <i>IN VITRO</i>	141-144
2.6.1. Determinación de la gliceroneogénesis y de la síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos a partir del piruvato.....	141-142
2.6.2. Determinación de la producción de glicerol-3-P y de la síntesis <i>de novo</i> de lípidos a partir de la glucosa.....	142-143
2.6.3. Determinación de la reesterificación de los ácidos grasos.....	143-144
2.6.4. Consumo de glucosa y producción de lactato por el WAT epididimal.....	144
2.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEPCK CITOSÓLICA.	144-145
2.8. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR A PARTIR DE EXTRACTOS TISULARES.....	145-148
2.8.1. Espectroscopia de la RMN de ¹³ C.....	146-147
2.8.2. Asignaciones de las posiciones de la RMN de ¹³ C del WAT y cálculos....	147-148
2.9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA CORPORAL.....	148
2.10. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS HEPÁTICOS.....	148-152

2.10.1. Determinación del contenido de glucógeno, glucosa-6-fosfato y lactato.....	149-151
2.10.1.1. Determinación del contenido de glucógeno.....	149-150
2.10.1.2. Determinación del contenido de glucosa-6-fosfato y lactato.....	150-151
2.10.2. Determinación del contenido de triglicéridos hepáticos.....	151-152
2.11. PCR SEMICUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.....	152-154
2.12. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS.....	155-158
2.12.1. Metabolitos sanguíneos.....	155-156
2.12.1.1. Glucosa sanguínea.....	155
2.12.1.2. Triglicéridos.....	155
2.12.1.3. Ácidos grasos libres.....	155-156
2.12.1.4. Glicerol.....	156
2.12.1.5. Lactato.....	156
2.12.1.6. β -hidroxibutirato.....	156
2.12.2. Hormonas séricas.....	157-158
2.12.2.1. Insulina.....	157
2.12.2.2. Leptina.....	157
2.12.2.3. Citoquinas: TNF- α e IL-6.....	157
2.12.2.4. Adiponectina.....	158
2.13. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.....	158-159
2.13.1. Análisis morfométricos.....	158-159
2.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	159
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	160-178

I. PRESENTACIÓN.

La obesidad y la diabetes de tipo 2 se han convertido en las dos grandes epidemias de los países desarrollados y en vías de desarrollo (James, 2004; Zimmet et al., 2001). El conocimiento de las causas y mecanismos que desencadenan el desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2 es de vital importancia para su posterior prevención y tratamiento. Tanto la producción de glicerol-3-fosfato como la obtención de ácidos grasos libres son fundamentales para la síntesis de triglicéridos por el tejido adiposo. Por tanto, alteraciones metabólicas primarias en el tejido adiposo que incrementen la obtención de glicerol-3-fosfato podrían aumentar su capacidad de almacenar lípidos, induciendo el desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2. En condiciones fisiológicas, se considera que el adipocito produce glicerol-3-fosfato a partir de la glucosa durante el periodo post-prandial, o a través de la gliceroneogénesis durante el ayuno.

Así, en la primera parte de este estudio, se analizaron los efectos de un incremento en la gliceroneogénesis del tejido adiposo a través de la sobreexpresión de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en ratones transgénicos. La sobreexpresión de PEPCK llevaba a un incremento en la reesterificación de ácidos grasos y un mayor depósito de lípidos en tejido adiposo. Sin embargo, aunque estos animales presentaron obesidad hipertrófica, mostraban una sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa similar a los controles. Ello probablemente era debido a la ausencia de niveles elevados de FFAs, leptina y TNF- α circulantes, junto con la ausencia de depósito de grasa en tejidos no adiposos y altos niveles de adiponectina sérica. Con el fin de estudiar si un incremento en la reesterificación de ácidos grasos era capaz de contrarrestar el incremento en los niveles séricos de FFAs y la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en lípidos, los animales transgénicos aP2-PEPCK se alimentaron con este tipo de dieta durante un corto período. Sin embargo, estos animales presentaban obesidad mórbida y una severa resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa respecto a los controles. Por tanto, los efectos combinados de la dieta alta en lípidos junto al incremento en la reesterificación de ácidos grasos en tejido adiposo,

probablemente saturaban la capacidad de éste de almacenar lípidos. Ello llevaba al depósito de lípidos en hígado y a hipertrigliceridemia. Además, la acumulación de lípidos en tejido adiposo marrón disminuía su capacidad termogénica. Todo ello probablemente contribuyó a la obesidad y resistencia a la insulina tan severas que presentaban estos animales transgénicos alimentados con una dieta alta en lípidos. Estos resultados sugieren que la regulación de la capacidad del tejido adiposo blanco para almacenar lípidos es crucial para el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina.

Por otra parte, un incremento en la fosforilación de la glucosa en tejido adiposo también podría llevar a una mayor esterificación de ácidos grasos y depósito de lípidos, a través de un aumento en su obtención de glicerol-3-fosfato. Por ello, en la segunda parte de la presente Tesis Doctoral, se expresó la enzima glucoquinasa (GK) en tejido adiposo de ratones, una enzima reguladora de la utilización de glucosa en hígado. La presencia de GK en tejido adiposo incrementaba su captación basal de glucosa, y mejoraba la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en estos animales. A pesar de la mayor utilización de glucosa en tejido adiposo blanco, ello no generaba más glicerol-3-fosfato ni alteraba el depósito de lípidos, sino que aumentaba su producción de lactato, incrementando sus niveles circulantes. Por tanto, estos resultados indican que un incremento de la captación de glucosa por parte del tejido adiposo no lleva a una mayor síntesis de lípidos sino a un aumento en la producción de lactato.

Todos estos resultados parecen indicar que la regulación del aporte de glicerol-3-fosfato contribuye al control de la síntesis de triglicéridos. Además, muestran la implicación directa de la PEPCK en la síntesis de glicerol-3-fosfato y resaltan el papel clave de la gliceroneogénesis en la reesterificación de ácidos grasos y la consiguiente acumulación de grasa, tanto en tejido adiposo blanco como marrón. Sin embargo, el incremento en la captación y utilización de la glucosa no es suficiente para promover la generación de glicerol-3-fosfato y el depósito de grasa.

II. INTRODUCCIÓN.

1. OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO: UN PROBLEMA DE SALUD MUNDIAL.

1.1. OBESIDAD: LA GRAN EPIDEMIA DEL SIGLO XXI.

En las últimas décadas, la prevalencia de la obesidad se ha disparado en el mundo occidental y en los países occidentalizados, convirtiéndola en la gran epidemia de nuestro tiempo. Según estimaciones actuales más de 1 billón de adultos en el mundo sufren sobrepeso y al menos 300 millones de éstos son clínicamente obesos (IDF, 2004). En Estados Unidos y en Europa, el 20% de los hombres y el 25% de las mujeres son obesos (James, 2004). En España, el porcentaje de población obesa se sitúa en el 13%, siendo Andalucía la Comunidad Autónoma con mayor porcentaje (16,9%) y Navarra con el menor (7,5%) (Martinez et al., 2004). Además, esta epidemia también afecta a los jóvenes (Schwartz and Puhl, 2003). En Estados Unidos, el número de niños y adolescentes con sobrepeso se ha doblado desde 1980 y se calcula que en el mundo ya hay 22 millones de niños menores de 5 años con sobrepeso (IDF, 2004).

La importancia del fenómeno pandémico de la obesidad radica sobretodo, y por encima de cualquier implicación estética, en los problemas de salud pública a los que se relaciona (NIH, 2004). La obesidad puede reducir la esperanza de vida en ocho años (IDF, 2004) e incluso, en poco años, se convertirá en la principal causa de mortalidad por encima del hábito de fumar (Bell et al., 2005).

1.2. OBESIDAD, SÍNDROME METABÓLICO Y DIABETES DE TIPO 2.

1.2.1. Obesidad.

La obesidad se ha relacionado con un gran número de alteraciones de la salud. Así, los individuos obesos o con sobrepeso presentan un incremento en el riesgo de padecer hipertensión, dislipidemia, diabetes de tipo 2, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, enfermedad cardíaca coronaria, angina de pecho, fallo cardíaco congestivo, infartos, cálculos biliares, colecistitis y colelitiasis, gota, osteoartritis, apnea obstructiva del sueño y problemas respiratorios, algunos tipos de cáncer (endometriales, prostáticos, de colon, de mama), complicaciones del embarazo (diabetes gestacional, hipertensión gestacional, preeclampsia), complicaciones en el parto (cesáreas), alteraciones de la fertilidad de la mujer (irregularidades menstruales, infertilidad, ovulaciones irregulares), problemas en el control de la micción (incontinencia por estrés), nefrolitiasis y desórdenes psicológicos (depresión, desórdenes en la conducta alimenticia, baja autoestima). Algunas de estas patologías asociadas a la obesidad han sido agrupadas bajo el término Síndrome Metabólico.

1.2.2. Síndrome Metabólico.

El Síndrome Metabólico también es conocido como Síndrome X (Reaven, 1988), Síndrome plurimetabólico o Síndrome de la Resistencia a la Insulina (IRS) (Zimmet, 2002). Este síndrome se define como un conjunto de factores de riesgo específicos de patologías cardiovasculares (CVD) cuya fisiopatología subyacente podría ser la resistencia a la insulina (Kahn et al., 2005). La Federación Internacional de Diabetes (IDF) ha propuesto recientemente una nueva definición en la que la resistencia a la insulina es sustituida por la obesidad visceral como elemento clave del síndrome (Alberti et al., 2005). Los factores de

riesgo incluidos en el síndrome han variado junto con las diferentes definiciones que se han descrito. En la definición propuesta por el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (Tercer Panel para el Tratamiento de los Adultos o ATP III) (NCEP, 2001), los factores de riesgo incluidos son:

- Circunferencia de la cintura: >102 cm en hombres y >88 cm en mujeres.
- Triglicéridos séricos: >1.7 mmol/l.
- Presión sanguínea: >130/85 mmHg.
- Colesterol contenido en lipoproteínas de elevada densidad (HDL): <1.0 mmol/l en hombres y <1.3 mmol/l en mujeres.
- Glucemia: >6.1 mmol/l.

A pesar del intento de agrupar diferentes factores de riesgo cuyo mecanismo fisiopatológico pudiera ser común, el valor diagnóstico del síndrome no está claro. El tratamiento del síndrome no difiere del tratamiento de cada uno de sus componentes ni el riesgo de enfermedades cardiovasculares asociadas al síndrome parece mayor que la suma de los distintos componentes. Así, se cuestiona la utilización del Síndrome Metabólico dada la ambigüedad de los criterios incluidos en las definiciones y la idoneidad de modificar algunos componentes del síndrome (Kahn et al., 2005).

1.2.3. Diabetes mellitus de tipo 2.

La diabetes mellitus de tipo 2, o diabetes mellitus independiente de insulina (NIDDM), está caracterizada por la resistencia a la insulina de los tejidos periféricos como la principal responsable, y aparecen sus síntomas cuando se acompaña del defecto en la secreción de la hormona. También es llamada "diabetes del adulto" porque afecta mayoritariamente a este grupo poblacional. Al menos en el inicio de la patología, o incluso a lo largo de toda la vida, no es necesaria la administración de la hormona para la supervivencia

de estos pacientes. La relación entre la obesidad y la diabetes de tipo 2 es clara, ya que la epidemiología de la diabetes de tipo 2 sigue la misma dinámica que la de la obesidad (IDF, 2004;WHO, 1999). Existen numerosos estudios que sugieren que la resistencia a la insulina es el primer signo de la diabetes de tipo 2. Una alteración funcional que afecte a las células β pancreáticas, a los hepatocitos, a las fibras musculares esqueléticas, a los adipocitos o al Sistema nervioso central puede llevar a una alteración en la homeostasis de la glucosa. La aparición de resistencia a la insulina en los diferentes tejidos insulino-dependientes desencadena distintas consecuencias según el tejido de que se trate. El músculo esquelético es el tejido responsable del 80% de la captación y utilización de la glucosa circulante. Así, la resistencia a la insulina a nivel muscular reduce la utilización de glucosa corporal. La producción hepática de glucosa está fuertemente inhibida por la insulina (DeFronzo et al., 1983). La falta de sensibilidad a la insulina en hígado induce un aumento de la producción de glucosa, contribuyendo a la hiperglucemia característica del estado diabético. El incremento en la producción de glucosa se produce principalmente por un aumento en la gluconeogénesis, aunque la glucogenolisis también se encuentra incrementada (Consoli et al., 1989). La resistencia a la insulina también reduce la captación de glucosa por el tejido adiposo y, aunque su utilización del azúcar es menor que la del músculo, también contribuye a la hiperglucemia diabética. Sin embargo, la inhibición de la lipólisis es el principal efecto de la insulina sobre el adipocito. Así, la resistencia a la insulina en el adipocito principalmente incrementa la liberación de ácidos grasos a la circulación, cuyos efectos contribuyen al desarrollo de la resistencia a la hormona en otros tejidos y a las alteraciones pancreáticas (Bays et al., 2004). El exceso de disponibilidad de ácidos grasos circulantes induce resistencia a la insulina en músculo esquelético (Kelley et al., 1993), resistencia a la capacidad de la insulina de suprimir la producción hepática de glucosa (Saloranta et al., 1991) e hipertrigliceridemia (Kissebah et al., 1976). Además, reduce la eliminación de insulina de la circulación sanguínea por el hígado (Hennes et al., 1990) y altera la secreción de insulina por las células β (McGarry and Dobbins, 1999;Zhou and Grill, 1994). Estas alteraciones provocadas

por el exceso de ácidos grasos circulantes, conocidas como lipotoxicidad, son las mismas que las asociadas a la obesidad. Por este motivo, las alteraciones en el flujo de ácidos grasos pueden ser responsables de algunas de las complicaciones metabólicas de la obesidad. La falta de acción de la insulina en cerebro incrementa la ingesta e induce obesidad, contribuyendo al desarrollo de la diabetes de tipo 2 (Schwartz and Porte, Jr., 2005). En respuesta a la resistencia a la insulina en tejidos periféricos, las células β pancreáticas incrementan su secreción de insulina, produciendo una hiperinsulinemia compensatoria para paliar la falta de efecto de la hormona (Ahren and Pacini, 2005). Mientras la secreción de insulina pueda ajustarse a la resistencia periférica a la hormona, la homeostasis de la glucosa no se encontrará gravemente alterada. En cambio, aparecerán los síntomas de la diabetes de tipo 2 si se produce un fallo en la secreción de insulina, ya sea por alteraciones en la señalización de la hormona en célula β , alteraciones en la producción de insulina o alteraciones en el metabolismo o en la masa de células β durante este periodo de compensación (Ahren and Pacini, 2005).

1.3. DEFINICIÓN DE SOBREPESO Y DE OBESIDAD.

La obesidad se define como un acúmulo excesivo de tejido adiposo. El índice de masa corporal (BMI) es el parámetro más aceptado en la determinación de la obesidad al proporcionar una buena medida indirecta de la grasa corporal. El BMI se define como el peso del individuo, en kilogramos, dividido por la altura, en metros, al cuadrado (kg/m^2). En algunos casos, como son en personas ancianas o en individuos muy musculosos o con mucha altura, este parámetro pierde su validez (James, 2004). Sin embargo, se ha establecido una clasificación consensuada de la obesidad a partir del BMI (WHO, 1999). Se consideran personas con sobrepeso aquellos individuos que muestran un BMI superior a los $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ e individuos obesos aquellos que presentan un BMI por encima de los $30 \text{ kg}/\text{m}^2$. Además, nos

referimos como individuos que presentan obesidad mórbida a aquellas personas que presentan un BMI superior a los 40 kg/m².

1.4. TIPOS DE OBESIDAD HUMANA.

La obesidad hace referencia a la expansión de todos los depósitos de grasa, aunque en general se produce de forma localizada. Así, podemos distinguir dos tipos de obesidad según la región corporal donde se produce el mayor incremento del depósito de grasa (Lafontan and Berlan, 2003; Montague and O'Rahilly, 2000):

-La obesidad visceral o abdominal (*upper-body obesity*), caracterizada por un acúmulo de grasa en la zona abdominal. En estos casos, se produce un incremento de la grasa subcutánea de la región abdominal superior y del depósito de grasa visceral, compuesto por la grasa del omento mayor, del omento menor y la grasa mesentérica. La grasa visceral representa el depósito de grasa corporal minoritario, aproximadamente un 5-8% en las mujeres, aunque puede alcanzar hasta un 20% en los varones. Por ello, a este tipo de obesidad también se le denomina obesidad andrógena (*android obesity*).

-El otro tipo de obesidad se caracteriza por un acúmulo de grasa especialmente localizado en las partes inferiores del cuerpo, sobretodo en el tejido adiposo subcutáneo femoral y gluteal. También se denomina *lower-body obesity* u obesidad ginoide (*gynoid obesity*), ya que es la forma de obesidad más habitual en las mujeres.

La obesidad visceral presenta un mayor grado de correlación con el riesgo de desarrollar las patologías asociadas a la obesidad, respecto a la *lower-body obesity* (Jensen, 1997; Kissebah et al., 1982). Por este motivo, actualmente se considera la distribución de grasa corporal, determinada como la medida de la circunferencia de la cintura y la relación cintura/cadera (WHR), un mejor indicador de riesgo respecto el BMI (Lev-Ran, 2001).

2. EL TEJIDO ADIPOSEO.

2.1. ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSEO.

El tejido adiposo se encuentra presente en todas las especies de mamíferos y en una amplia variedad de especies no mamíferas. Podemos diferenciar dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo marrón (BAT). El tejido adiposo está formado por: adipocitos maduros, células vasculares y del estroma (células de soporte), vasos sanguíneos, nódulos linfoides y nervios. Cada adipocito se encuentra próximo a un capilar sanguíneo (Crandall et al., 1997). El aporte sanguíneo del tejido adiposo proporciona los sustratos metabólicos necesarios y recoge los distintos productos metabólicos originados. Aunque el flujo sanguíneo en el tejido adiposo, expresado como mililitros de sangre por cada 100 gramos de tejido y por minuto, parezca pequeño comparado con otros tejidos, la situación cambia radicalmente si es expresado por célula. En humanos delgados, el tejido adiposo recibe 0.2-0.6 litros de sangre por minuto, un 3-7% del gasto cardíaco, mientras que en individuos obesos mórbidos puede representar el 15-30% del gasto cardíaco (Alexandre et al., 1962). El tejido adiposo marrón se encuentra más densamente vascularizado que el blanco, lo que macroscópicamente le confiere una coloración más rojiza que permite su identificación.

Además, el tejido adiposo contiene nódulos linfoides cuyo número depende de la localización del depósito (Pond, 1996). El tejido adiposo se encuentra inervado tanto por neuronas post-ganglionares del sistema nervioso simpático (SNS) como por nervios sensitivos (Hausman et al., 2001). Se ha identificado la presencia de neurotransmisores típicos de las fibras nerviosas sensitivas, como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en tejido adiposo. Aunque no se conoce aún la función fisiológica de la inervación sensitiva, ésta podría regular la irrigación sanguínea e incluso la diferenciación celular (Giordano et al., 1998). En cambio, la inervación por el SNS, mayoritariamente fibras

noradrenérgicas, controla la movilización de lípidos al regular la lipólisis (Bartness and Bamshad, 1998). La inervación del tejido adiposo marrón es más densa que la del blanco. Incluso se han encontrado fibras nerviosas colinérgicas pertenecientes al sistema nervioso parasimpático (SNP), además de las fibras nerviosas noradrenérgicas del SNS. Esta doble inervación del tejido adiposo marrón podría regular su capacidad termogénica (Giordano et al., 2004).

2.2. TIPOS DE ADIPOCITOS MADUROS.

2.2.1. Los adipocitos blancos.

El componente celular mayoritario del tejido adiposo blanco son los adipocitos blancos. Microscópicamente, el adipocito blanco maduro es una célula más o menos esférica que acumula grasa de forma unilocular, es decir, presenta una única gota de grasa. Esta gota lipídica ocupa prácticamente todo el citoplasma de la célula, mientras que el núcleo, mitocondrias y el resto de orgánulos citoplasmáticos quedan en la periferia, entre la membrana plasmática y la gota (Figura 1).

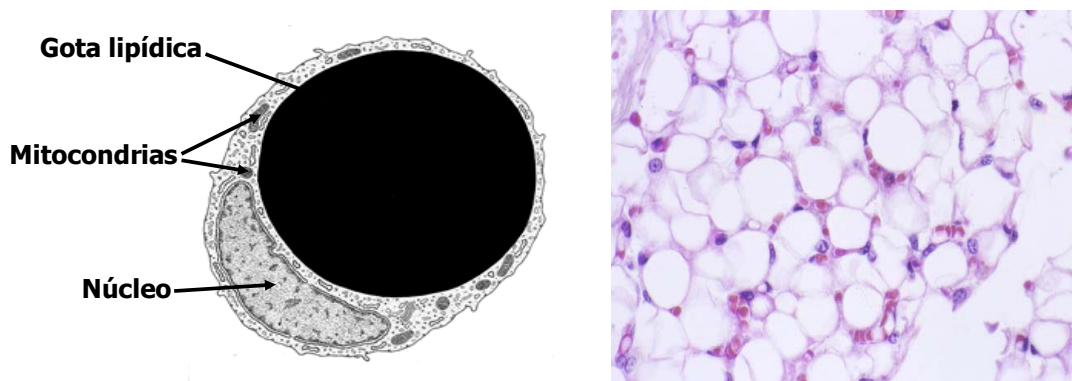


Figura 1. El adipocito blanco. Esquema de un adipocito blanco e imagen histológica de una sección de tejido adiposo blanco teñida con hematoxilina-eosina.

2.2.2. Los adipocitos marrones.

En cambio, el adipocito marrón maduro acumula grasa de forma multilocular, es decir, presenta múltiples gotas lipídicas de distintos tamaños. Por ello, la forma de almacenamiento intracelular de grasa es una de las principales características microscópicas utilizadas para diferenciar los dos tipos de adipocitos. Además, el adipocito blanco presenta un bajo número de mitocondrias, mientras que el adipocito marrón presenta multitud de mitocondrias dispersas en su citoplasma (Figura 2).

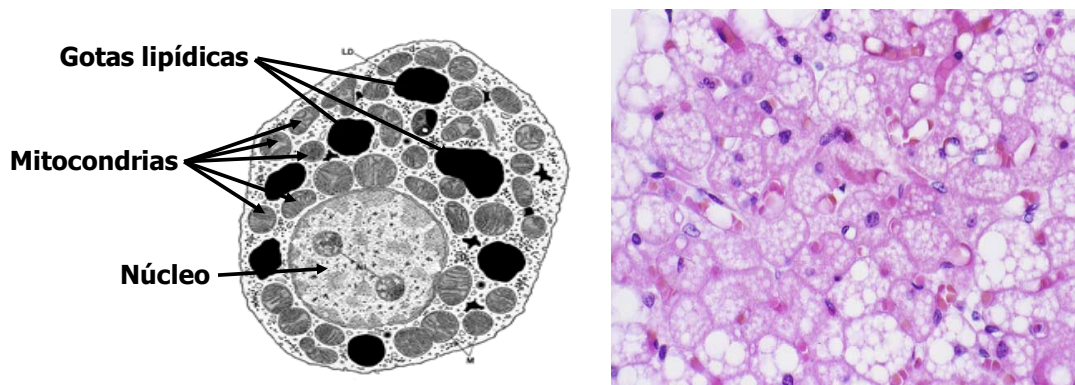


Figura 2. El adipocito marrón. Esquema de un adipocito marrón e imagen histológica de una sección de tejido adiposo marrón teñida con hematoxilina-eosina.

2.3. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL TEJIDO ADIPOSO.

Los adipocitos blancos murinos se encuentran ampliamente distribuidos por todo el organismo, principalmente en la región subcutánea, dérmica e intraperitoneal (Figura 3). También podemos encontrarlos en el músculo esquelético, tanto alrededor del conjunto de fibras musculares (intermuscular) como alrededor de las fibras musculares (intramuscular). Incluso es posible encontrar adipocitos blancos en otras localizaciones como médula ósea, páncreas, glándula parótida y paratiroides (Cinti, 2005). El tejido adiposo blanco no siempre crece o responde uniformemente al estímulo que le obliga a almacenar lípidos o a movilizarlos.

Actualmente se conocen diferencias específicas del tipo de depósito de WAT de que se trate, tanto en su morfología como en su respuesta ante los mismos estímulos, especialmente las respuestas proliferativas (Hausman et al., 2001). Además, también existen diferencias metabólicas entre los distintos depósitos de grasa. Los adipocitos del WAT mesentérico presentan un mayor metabolismo de la glucosa y una mayor producción de lactato respecto al resto de adipocitos. Es más, estos adipocitos mesentéricos son más pequeños y menos sensibles a la insulina respecto a la utilización de la glucosa. Aunque presentan la misma respuesta lipolítica estimulada por hormonas, muestran una mayor capacidad lipolítica basal (Hausman et al., 2001).

Los adipocitos marrones no se distribuyen por el organismo tan difusamente como los blancos. Además de las regiones visibles macroscópicamente (Figura 3), microscópicamente podemos encontrar adipocitos marrones en la región inguinal, periovárica y retroperitoneal, incluso grupos o "*clusters*" de adipocitos marrones entre los adipocitos blancos en los distintos depósitos de WAT (Cinti, 2005).

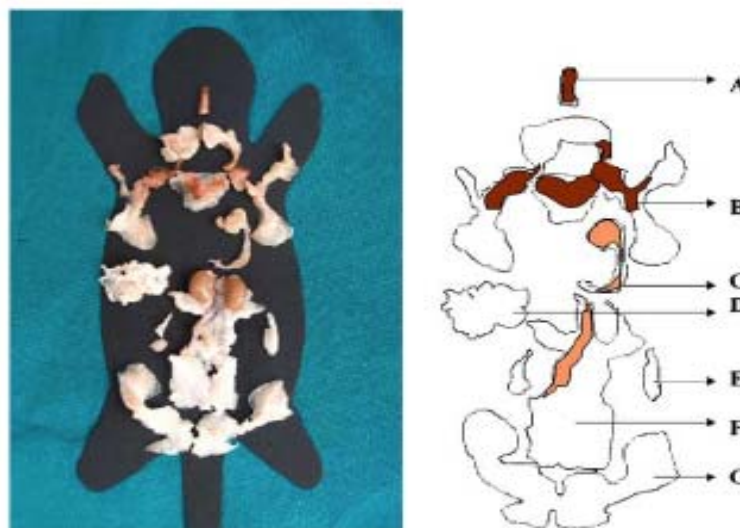


Figura 3. Distribución del tejido adiposo blanco y marrón en una hembra adulta de ratón. Se muestra tanto la disección de los depósitos de grasa subcutáneos y viscerales más representativos, así como un esquema en donde la coloración de las áreas indicadas representa el tipo de tejido adiposo mayoritario (blanco=WAT; marrón=BAT). **A**= depósito cervical profundo; **B**=depósito subcutáneo anterior que incluye el interescapular, subescapular, axilo-torácico y cervical superficial; **C**= depósito mediastínico visceral; **D**= depósito mesentérico visceral; **E**= depósitos viscerales perirenal, periovárico, parametrial y perivesical; **G**= depósito subcutáneo posterior que incluye el dorso-lumbar, inguinal y gluteal. Fuente: Cinti S, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 73:9-15, 2005 (Cinti, 2005).

2.4. EL ÓRGANO ADIPOSO Y LA TRANSDIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO.

De la clásica simpleza de tejido inerte, el tejido adiposo ha demostrado poseer una compleja organización con diferentes relaciones entre los diversos tipos celulares contenidos y un comportamiento distinto entre los depósitos regionales de grasa. El tejido adiposo blanco y el marrón presentan diferencias morfológicas, de distribución anatómica y de funcionalidad derivada del tipo de adipocito que los compone. Ambos adipocitos son tipos celulares distintos por su capacidad metabólica, por los genes que expresan y por sus funciones. Sin embargo presentan similitudes, como la capacidad para acumular/liberar ácidos grasos, presencia de receptores adrenérgicos específicos (β_3 -adrenérgicos) e incluso comparten célula precursora. Por ello, en los últimos años se ha reintroducido el concepto de órgano adiposo (*adipose organ*) formado tanto por adipocitos blancos como marrones, propuesto en 1940 por *Wells* (Cinti, 2005). El órgano adiposo de los mamíferos está compuesto por diferentes depósitos de grasa localizados en diferentes regiones anatómicas (Figura 3). Aunque algunos depósitos de grasa tienen un componente mayoritario blanco (WAT) y otros mayoritariamente marrón (BAT), todos ellos están formados por una combinación de ambos. Las proporciones de la población de cada tipo celular son determinadas por la edad, la especie y las condiciones ambientales y nutricionales (Cinti, 2005). Aunque los adipocitos blancos y marrones se originan a partir de un precursor común, algunos estudios sugieren que la célula adiposa madura es capaz de transdiferenciarse en un tipo u otro de adipocito. Cada tipo celular, cada célula diferenciada posee unas características fenotípicas y funcionales concretas y propias. La transdiferenciación es un fenómeno biológico en el que una célula diferenciada es capaz de diferenciarse en otro tipo celular, sin necesidad de desdiferenciarse a una célula menos madura y más indiferenciada (Tosh and Slack, 2002). El adipocito blanco maduro es capaz de transdiferenciarse a adipocito marrón y viceversa, probablemente regulando la expresión de la proteína desacopladora 1 (UCP1) a través de sus receptores β_3 -adrenérgicos (Cinti, 2005). De esta forma, el órgano adiposo se convierte en el órgano con mayor capacidad de adaptación a

las necesidades energéticas, al estar formado por dos tipos de adipocitos maduros y un precursor común, junto con la posibilidad de transdiferenciarse en uno u otro sin necesidad de recurrir al precursor común (Cinti, 2005).

2.5. CRECIMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO.

El tejido adiposo blanco es el tejido con mayor plasticidad del organismo, siendo el único tejido del cuerpo que puede cambiar drásticamente su masa a pesar de haber alcanzado la edad adulta. Su porcentaje respecto al peso corporal puede ser muy variable según individuos, pudiendo representar desde el 2-3% en los atletas profesionales al 60-70% en los casos de obesidad humana extrema (Hausman et al., 2001). La población de adipocitos maduros en el tejido adiposo blanco incluye células de tamaños muy variables, desde adipocitos muy pequeños de menos de 35 μm de diámetro hasta adipocitos de 200 μm . Cuando la población de adipocitos incrementa de tamaño, debido al crecimiento o durante el desarrollo de la obesidad, la heterogeneidad de la población de los adipocitos disminuye. Esto sugiere la existencia de un "tamaño máximo del adipocito" o tamaño crítico, el cual depende de la especie animal y la localización del depósito graso (Hausman et al., 2001).

El crecimiento del tejido adiposo involucra dos respuestas celulares del adipocito: la hipertrofia o incremento del tamaño celular, y la hiperplasia o incremento del número de células. La hipertrofia de los adipocitos se produce como resultado de un incremento en la acumulación de triglicéridos en adipocitos ya existentes, cuando la ingestión de energía sobrepasa al gasto energético. Sin embargo, la hiperplasia de los adipocitos se produce como resultado del reclutamiento de nuevos adipocitos a partir de células precursoras o preadipocitos. Estos preadipocitos proliferan y se diferencian hasta adipocitos maduros a través de un proceso denominado adipogénesis. La hiperplasia suele ser precedida por la hipertrofia y también se produce por un balance energético positivo (Bjorntorp, 1974; Johnson et al., 1978). Los términos de hipertrofia e hiperplasia también se aplican a la obesidad,

reflejando el tipo de crecimiento del tejido adiposo, especialmente del blanco. En la gran mayoría de casos humanos, la obesidad es hipertrófica mientras que la presencia de hiperplasia se utiliza como un signo de obesidad de peor pronóstico (Hirsch and Batchelor, 1976). El tipo de crecimiento celular que predomina en un depósito de grasa u otro, hipertrofia *versus* hiperplasia, está determinado por varios factores de regulación. En el tejido adiposo blanco, entre estos factores se incluyen la población de preadipocitos, la capacidad de perfusión sanguínea y la densidad de terminaciones nerviosas que lo inervan. Se ha descrito una relación inversa entre el grado de inervación simpática y la capacidad del tejido para proliferar (DiGirolamo et al., 1998).

La adipogénesis tiene lugar a lo largo de toda la vida del organismo, desde el periodo prenatal hasta la etapa adulta, debido tanto a la continua renovación celular como a las cambiantes necesidades energéticas (Rangwala and Lazar, 2000; Rosen and Spiegelman, 2000). El complejo proceso de diferenciación del preadipocito está controlado hormonalmente y desencadenado por la aparición secuencial de diferentes factores de transcripción hasta la consecución de la expresión de aquellos genes característicos del adipocito maduro. Los principales factores de transcripción implicados pertenecen a tres grandes familias: la familia de proteínas inductoras de la transcripción que se unen a la secuencia CCAAT (C/EBPs), la familia de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) y la familia de proteínas de unión a elementos que responden a los esteroides (SREBPs).

2.5.1. La familia C/EBPs.

La familia C/EBPs engloba diferentes proteínas nucleares capaces de reconocer y unirse a una determinada secuencia de DNA (CCAAT), presente en los promotores de algunos genes, promoviendo su expresión transcripcional. Cuatro de los seis miembros de la familia C/EBPs son expresados por el tejido adiposo, aunque no de forma específica de tejido: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ y C/EBP ζ . Mientras que C/EBP β y C/EBP δ son expresados en la fase

de diferenciación temprana, C/EBP α es inducido en la fase tardía. Se ha demostrado la implicación de C/EBP β y C/EBP δ en la cascada de la adipogénesis como inductores directos de la transcripción del PPAR γ (Rosen and Spiegelman, 2000; Tanaka et al., 1997; Yeh et al., 1995). C/EBP α es uno de los principales reguladores y desencadenantes del proceso de diferenciación, tanto en los adipocitos blancos como marrones. La expresión de C/EBP α también es inducida por PPAR γ , y la expresión de éste por C/EBP α , creándose así un *feedback* positivo que refuerza la expresión de ambos y asegura la diferenciación completa del preadipocito (Rosen and Spiegelman, 2000). Promotores de varios genes específicos del adipocito presentan lugares de unión para C/EBPs, como el transportador de glucosa GLUT4, la proteína intracelular de unión a lípidos específica del adipocito aP2/422, las enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y ácido graso sintasa, y las proteínas desacopladoras de la fosforilación oxidativa (Rangwala and Lazar, 2000).

2.5.2. La familia PPARs.

Se conocen tres miembros de la familia PPARs: PPAR α , PPAR δ o PPAR β y PPAR γ . PPAR γ juega un papel central en el proceso de diferenciación, siendo el principal regulador y desencadenante junto con C/EBP α . Aunque podrían activar los mismos genes diana de PPAR γ , PPAR α y PPAR δ no están implicados en la adipogénesis del adipocito blanco (Rangwala and Lazar, 2000). Sin embargo, PPAR α y PPAR δ adquieren una mayor importancia en el caso de los adipocitos marrones. Ambos regulan la expresión de genes relacionados con la β -oxidación de ácidos grasos (Rosen and Spiegelman, 2000) y además PPAR δ promueve la expresión de UCP1 (Wang et al., 2003).

Existen dos isoformas de PPAR γ , PPAR γ 1 y PPAR γ 2, generadas a partir de un gen único gracias a promotores alternativos, aunque en humanos se ha descrito una tercera isoforma (PPAR γ 3) (Fajas et al., 1998; Rangwala and Lazar, 2000). Mientras que PPAR γ 1 está ampliamente expresado, predominantemente en tejido adiposo blanco y marrón, la isoforma

PPAR γ 2 es específica y altamente expresada en el blanco. PPAR γ 3 se expresa en tejido adiposo e intestino delgado. PPAR γ reconoce lugares de unión al DNA y forma heterodímeros con otro factor nuclear, el receptor X para retinoides (RXR), en concreto con su isoforma RXR α . Se han descrito lugares de unión para PPAR γ en promotores de genes específicos del adipocito, como los de las proteínas aP2 y PEPCK, siendo absolutamente necesaria la unión de PPAR γ para su expresión (Rangwala and Lazar, 2000; Rosen and Spiegelman, 2000). La actividad de este tipo de factores nucleares está determinada por la unión con su ligando. Según su naturaleza, existen dos tipos de ligandos para PPAR γ : ligandos naturales y ligandos sintéticos. Entre sus ligandos naturales se encuentran ácidos grasos y sus derivados, como las prostaglandinas J₂ y D₂ (PGJ₂ y PGD₂), siendo la prostaglandina 15-deoxi- Δ ^{12,14} PGJ₂ el más potente (Forman et al., 1995). Pero los ligandos para PPAR γ más potentes que se conocen son las tiazolidinedionas (TZDs), familia de fármacos sintéticos con propiedades antidiabéticas (Lehmann et al., 1995). Las TZDs no sólo poseen efectos hipoglucemiantes sino que también promueven la adipogénesis al comportarse como agonistas selectivos de alta afinidad para PPAR γ .

La expresión de UCP1 durante la diferenciación del preadipocito decanta la célula adiposa hacia la diferenciación a adipocito marrón. Aunque PPAR δ puede promover la expresión UCP1, su principal regulador transcripcional es PPAR γ , el cual desempeña la misma función reguladora de la adipogénesis tanto en el adipocito blanco como en el marrón. PPAR γ promueve la expresión de UCP1, de forma diferencial y exclusiva en la diferenciación del adipocito marrón, a través del factor coactivador-1 α del PPAR γ (PGC-1 α) (Puigserver et al., 1998). Aunque PGC-1 α también se expresa en tejido adiposo blanco, sus niveles de expresión son mucho más altos en el marrón. PGC-1 α coactiva al heterodímero formado por PPAR γ y RXR α para activar la expresión de UCP1, y así regular la adipogénesis hacia la diferenciación a adipocito marrón. Se conocen otras proteínas coactivadoras que intervienen en la adipogénesis diferencial por PPAR γ en ambos tipos de adipocitos, el coactivador-1 del receptor activado por esteroides (SRC-1) y el factor transcripcional intermediario-2 (TIF2) (Rosen and

Spiegelman, 2000). Ambas proteínas interaccionan con PGC-1 α , y sus complejos con él tienen una actividad coactivadora transcripcional diferente (Picard et al., 2002). Mientras que el complejo PGC-1 α -SRC-1 es más activo y promueve la termogénesis, el complejo PGC-1 α -TIF2 es menos activo e induce un mayor depósito de grasa. Por tanto, la relación existente entre TIF2 y SRC-1, junto con PGC-1 α , permiten a PPAR γ regular la diferenciación del preadipocito hacia adipocito blanco o marrón.

2.5.3. La familia SREBPs.

SREBP-1 es el miembro de la familia SREBPs involucrado en la adipogénesis. SREBP-1 es un factor de transcripción que se une a una región específica del DNA (CANNTG) o *E-box motif* que responde a esteroides. A partir de un único gen y mediante dos inicios de transcripción alternativos, se obtienen dos isoformas, SREBP-1a y SREBP-1c o ADD-1. Además de regular el metabolismo del colesterol, SREBP-1/ADD-1 regula el metabolismo lipídico al inducir la captación y la síntesis de lípidos. Aunque está implicado en la adipogénesis, no tiene un efecto tan importante como C/EBP α y PPAR γ . SREBP-1/ADD-1 induce PPAR γ , incluso la producción de ligandos endógenos de PPAR γ (Kim and Spiegelman, 1996; Kim et al., 1998). Además, SREBP-1/ADD-1 está regulado *in vivo* tanto nutricionalmente, durante el ayuno y la realimentación, como hormonalmente a través de la insulina, relacionando así los cambios nutricionales con la adipogénesis/lipogénesis (Rosen and Spiegelman, 2000).

2.5.4. Regulación transcripcional de la adipogénesis.

A partir de los numerosos estudios sobre la proliferación y diferenciación del adipocito, especialmente *in vitro*, se ha establecido un modelo de "cascada transcripcional". El modelo más aceptado es el propuesto por *Rosen y Spiegelman* (Rosen and Spiegelman, 2000) (Figura 4). En este modelo, el proceso de diferenciación se inicia con la activación de los

factores de diferenciación temprana, C/EBP β y C/EBP δ , a través de estímulos hormonales pro-adipogénicos. Estos dos factores inducen la expresión y activación de PPAR γ , el cual a su vez activa C/EBP α . En el modelo se incluye el *feedback* positivo entre C/EBP α y PPAR γ que mantiene la diferenciación del preadipocito, una vez iniciada. La activación de PPAR γ también está regulada tanto por su unión a sus ligandos como por su unión al receptor nuclear RXR α . También se incluye la regulación de PPAR γ por SREBP-1/ADD-1, tanto a nivel transcripcional como a nivel de producción de sus ligandos. Además de establecer una inducción de la adipogénesis independiente de C/EBP β y C/EBP δ , SREBP-1 permite integrar una regulación nutricional y hormonal al control de la adipogénesis. Además de estos factores de transcripción, otros factores pueden estar implicados en la inducción o en el mantenimiento del proceso de diferenciación, aunque tienen un papel regulador menor.

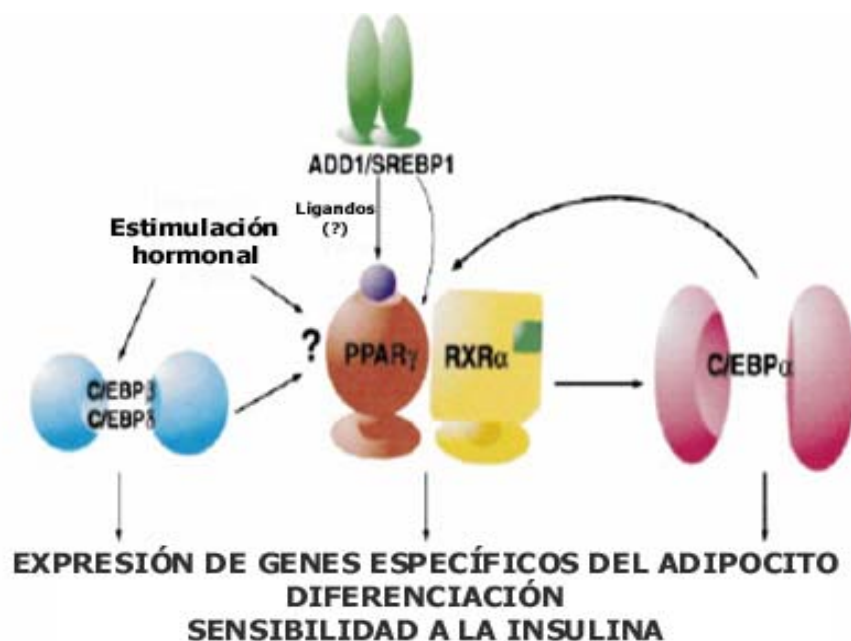


Figura 4. Modelo del control transcripcional de la adipogénesis. Se muestran los principales factores de transcripción implicados y sus relaciones. Fuente: Rosen ED and Spiegelman BM, Annu Rev Cell Dev Biol 2000 (Rosen and Spiegelman, 2000).

2.6. FUNCIONES DEL ÓRGANO ADIPOSEO.

La principal función del órgano adiposo es regular la homeostasis energética, desarrollando un papel central gracias a la distinta funcionalidad del adipocito blanco y del marrón. Durante años, el adipocito blanco se consideró una célula "inerte" que almacena y libera la energía de forma pasiva (Figura 5A). Los lípidos, en concreto los triglicéridos, son las moléculas biológicas a partir de las cuales podemos obtener más energía, ya que presentan una capacidad calórica de aproximadamente 9 kcal/g, el doble que otros sustratos energéticos como la glucosa y las proteínas. El adipocito blanco sintetiza triglicéridos, a partir de ácidos grasos libres durante la alimentación, y los degrada durante el ayuno liberando a la circulación ácidos grasos y glicerol. Estos dos procesos se denominan lipogénesis y lipólisis, respectivamente. Estas funciones contrapuestas del adipocito están reguladas principalmente por la insulina. Por el contrario, la principal función fisiológica del adipocito marrón es la generación de calor para el mantenimiento de la temperatura corporal. Aunque la lipogénesis y la lipólisis también ocurren en el adipocito marrón, ambas están más implicadas en la regulación de su capacidad termogénica. Además de estas funciones, en la actualidad se le otorga al adipocito, tanto blanco como marrón, un papel más activo gracias a su capacidad secretora de proteínas, antes desconocida (Figura 5B).

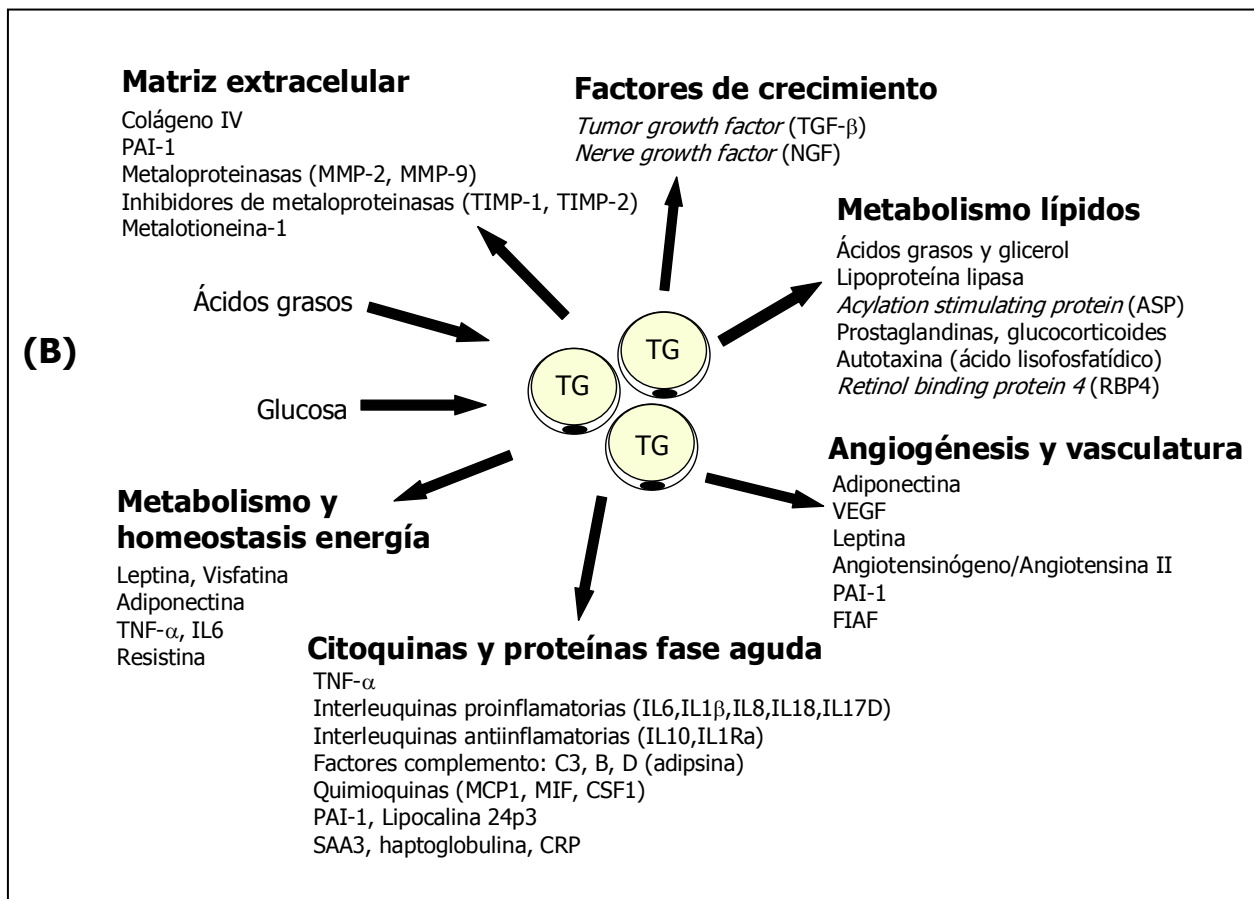
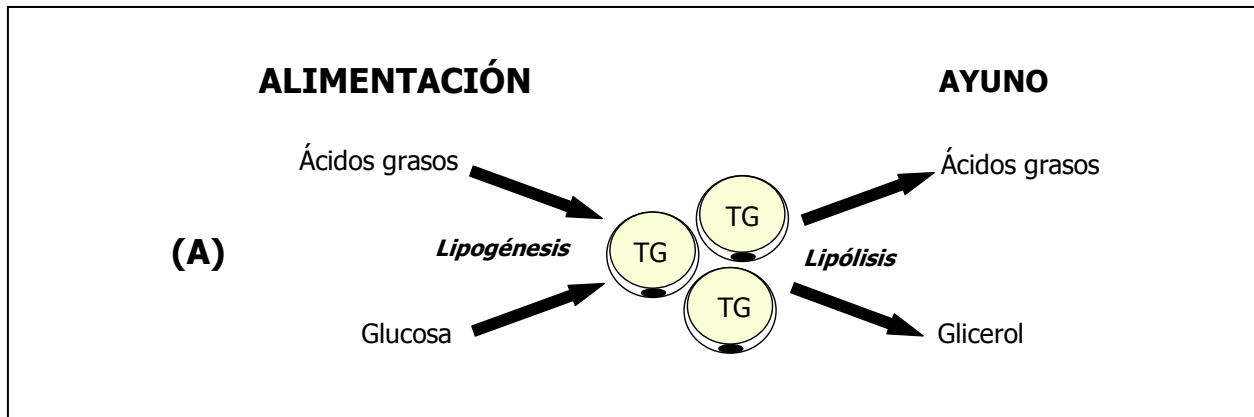


Figura 5. Evolución de la funcionalidad del adipocito. A) Esquema que representa la visión clásica del adipocito como depósito inerte para el almacenamiento de lípidos. **B)** Visión actual del adipocito como célula secretora de múltiples moléculas implicadas en diferentes procesos, además del almacen y liberación de sustratos energéticos. CRP: *C-reactive protein*; CSF1: *Colony stimulating factor-1*; FIAF: *Fasting-induced adipocyte factor*; MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*; MIF: *macrophage migration inhibitory factor*; PAI-1: *Plasminogen activator inhibitor-1*; SAA3: *Serum amyloid A 3*; VEGF: *Vascular endothelial growth factor*.

2.6.1. Función lipogénica del adipocito.

Los triglicéridos son sintetizados a partir de la esterificación de tres cadenas de ácidos grasos libres (FFAs) con una molécula de glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P), principalmente en hígado y adipocito. Este proceso de síntesis es conocido como lipogénesis. La principal fuente de ácidos grasos para los adipocitos son los lípidos circulantes, ya sean procedentes de la dieta o los sintetizados en el hígado. Debido a su gran tamaño, los lípidos circulantes no pueden ser captados como tales, así que han de ser hidrolizados a ácidos grasos y glicerol por la lipoproteína lipasa, previa a su captación. Los adipocitos son capaces de captar ácidos grasos mediante un transporte activo a través de proteínas transportadoras específicas. Una vez en el interior de los adipocitos, los FFAs son esterificados para formar los triglicéridos, los cuales se acumularán. Los ácidos grasos también pueden ser sintetizados *de novo* a partir de precursores, como la glucosa, por un proceso denominado síntesis o lipogénesis *de novo*. Aunque el hígado es el principal tejido donde se produce la lipogénesis *de novo*, el adipocito también puede sintetizar ácidos grasos *de novo*. Independientemente del origen de los ácidos grasos, para que puedan ser esterificados necesitan glicerol-3-P como "esqueleto" de los triglicéridos. El glicerol-3-P puede ser sintetizado por las células a partir de la fosforilación del glicerol, tanto del procedente de la lipólisis como el glicerol exógeno, reacción catalizada por la enzima glicerol quinasa, o ser sintetizado *de novo*. Al menos en condiciones normales, el adipocito blanco no puede utilizar el glicerol como sustrato para la esterificación de ácidos grasos, por su bajísima actividad glicerol quinasa, aunque el tejido adiposo marrón sí podría hacerlo (Hanson and Reshef, 2003). Ante la necesidad de sintetizar glicerol-3-P para la síntesis de triglicéridos, se considera que el tejido adiposo tiene dos formas de obtenerlo: a través de precursores como el piruvato y el lactato gracias a la gliceroneogénesis, o a través de la glucosa (Figura 6).

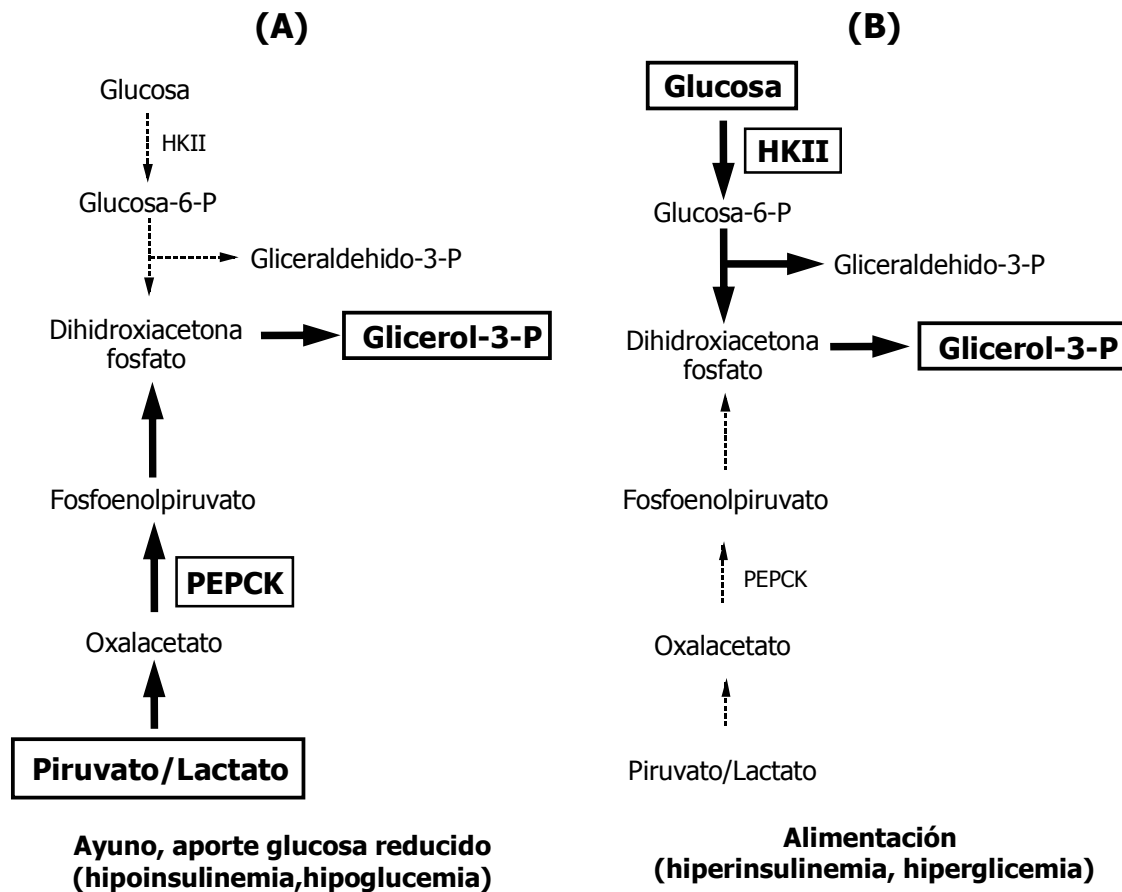


Figura 6. Producción de glicerol-3-P por el adipocito. Se considera la existencia de dos vías de síntesis de glicerol-3-P en el tejido adiposo: **(A)** Durante los periodos de ayuno a partir de precursores gluconeogénicos, como el piruvato y lactato a través de la gliconeogénesis. **(B)** Durante el periodo postprandial a partir de la glucosa.

2.6.1.1. Producción de glicerol-3-fosfato.

Se considera la glucosa como la principal fuente de glicerol-3-P para el adipocito a través de uno de sus intermediarios durante la glucólisis, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Figura 6B). La mayor captación de glucosa por parte del adipocito se produce a través del transportador de glucosa estimulado por la insulina (GLUT4). La glucosa captada se metaboliza a través de las reacciones glucolíticas, siendo la primera de ellas su fosforilación por una familia de enzimas, las hexoquinas. La insulina también induce la expresión de la hexoquinasa 2 (HKII), regulando tanto la captación como la fosforilación de glucosa por el adipocito. Durante la glucólisis, a partir de la escisión de una hexosa, se produce la formación de dos triosas, el gliceraldehido fosfato y la DHAP. Ambas triosas pueden isomerizarse la una

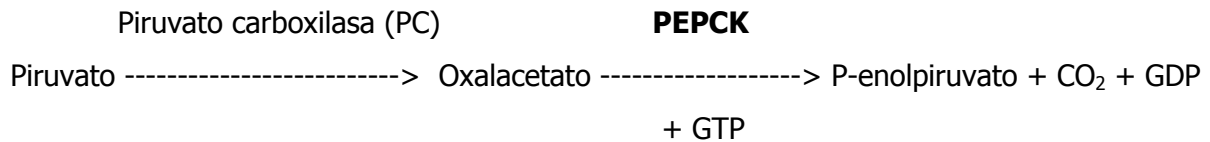
en el otra, a través de la enzima triosafosfato isomerasa. La DHAP producida a partir de la glucosa es isomerizada a gliceraldehido-P, ya que únicamente éste continuará a lo largo de las restantes reacciones glucolíticas. No obstante, la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) puede reducir la DHAP a glicerol-3-P, desviando parte de la DHAP producida hacia la síntesis de triglicéridos.

Aunque ésta podría ser la principal forma de producir glicerol-3-P en tejido adiposo, queda limitada a situaciones de excedencia energética (Figura 6B). Sin embargo, en periodos de ayuno o aporte reducido de glucosa, el tejido adiposo blanco puede obtener glicerol-3-P a partir del piruvato o del lactato, para sintetizar triglicéridos de una forma independiente de la insulina y de la glucosa (Figura 6A). Esta vía metabólica, denominada gliceroneogénesis, involucra a enzimas generalmente asociadas a la gluconeogénesis hepática, como la piruvato carboxilasa (PC), la alanina y aspartato aminotransferasas y, sobretodo, la forma citosólica de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK-C). Aunque originalmente fue descrita en tejido adiposo blanco, la gliceroneogénesis también se produce en hígado (Botion et al., 1995), en tejido adiposo marrón (Brito et al., 1999) e incluso podría producirse en músculo e intestino delgado (Hanson and Reshef, 2003). A pesar de su importancia en la síntesis de triglicéridos, no está clara la implicación de la producción de glicerol-3-P en el desarrollo de la obesidad.

2.6.1.2. Reesterificación de ácidos grasos: papel de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Una parte de los ácidos grasos procedentes de la lipólisis en el tejido adiposo es reesterificada nuevamente por el mismo gracias a la gliceroneogénesis. Actualmente, se considera que la reesterificación de FFAs en WAT funciona como un sistema que limita la liberación de FFAs, evitando su salida masiva hacia la circulación, especialmente cuando la lipólisis está estimulada. De esta forma, puede mantenerse constante el porcentaje de FFAs liberados, independientemente que la lipólisis está estimulada o no (Forest et al., 2003; Reshef et al., 2003). Tanto la gluconeogénesis hepática como la gliceroneogénesis en tejido adiposo e

hígado están reguladas por la PEPCK. La PEPCK es una enzima que interviene en la segunda etapa de la reacción que convierte el piruvato en fosfoenolpiruvato (P-enolpiruvato), fundamental para la gluconeogénesis y la gliceroneogénesis:



Tras la carboxilación del piruvato a oxalacetato gracias a la PC y la posterior descarboxilación oxidativa del oxalacetato a P-enolpiruvato, a través de la PEPCK, el P-enolpiruvato es convertido en DHAP, y finalmente en glicerol-3-P (Hanson and Reshef, 2003). Se han descrito dos isoformas de la PEPCK en mamíferos: la PEPCK-C, localizada a nivel citosólico (Nordlie and Lardy, 1963) y la PEPCK-M, a nivel mitocondrial (Utter and Kurahashi, 1954). Aunque ambas se describieron primero en hígado, también se han descrito en tejido adiposo (Ballard et al., 1967). La síntesis de ambas isoformas es independiente al estar codificadas por dos genes independientes, *Pck1* y *Pck2* (citosólica y mitocondrial, respectivamente). Aunque catalizan la misma reacción y presentan cinéticas muy similares, la regulación de su actividad es distinta. PEPCK-M tiene una actividad constitutiva (Ballard et al., 1967; Garber et al., 1972) mientras que la isoforma citosólica tiene una actividad modulada por hormonas (Ballard et al., 1967).

Como la PEPCK-C es la principal enzima reguladora de la gliceroneogénesis y de la gluconeogénesis, la determinación de la actividad PEPCK-C refleja el estado de ambas vías. Se han realizado multitud de estudios sobre la regulación de la actividad PEPCK-C, especialmente la hepática. Aún no se conoce ningún tipo de regulación post-traducciona, con lo que cambios en su actividad reflejan directamente cambios en la expresión de su mRNA, ya sea en su síntesis y/o en su degradación (Forest et al., 1997). El gen de la PEPCK-C de rata presenta un tamaño aproximado de 7 kb y está formado por 9 intrones y 10 exones con un único promotor (Yoo-Warren et al., 1983). Este gen codifica un mRNA de 2624 nucleótidos que se traduce en una proteína de 621 aminoácidos, aproximadamente de 69 kDa de peso molecular. La

expresión del gen *Pck1* se produce principalmente en hígado, riñón y tejido adiposo, y en menor proporción, en epitelio intestinal, glándula mamaria, pulmón, cerebro, colon, corazón y músculo esquelético (Hanson and Garber, 1972). El gen *Pck1* es único para todos los tejidos y presenta un único inicio de transcripción, por lo que la expresión específica de tejido involucra factores de transcripción específicos del tipo celular (Beale and Tishler, 1992).

La síntesis y actividad de PEPCCK-C en tejido adiposo varía en estados de ayuno o de realimentación, sugiriendo un papel importante durante estas situaciones fisiológicas. Durante el ayuno y tras una inyección de noradrenalina, ambas están incrementadas (Hopgood et al., 1973; Meyuhas et al., 1976; Reshef et al., 1970). Durante la realimentación, caracterizada por una hiperinsulinemia, se produce una disminución de los niveles intracelulares de cAMP, y la síntesis y actividad de PEPCCK disminuyen (Beale and Tishler, 1992; Hopgood et al., 1973; Meyuhas et al., 1976; Reshef et al., 1970). Los glucocorticoides producen una inhibición de la expresión de PEPCCK en tejido adiposo, situación contraria a la observada en hígado (Franckhauser et al., 1995; Granner et al., 1983; Nechushtan et al., 1987; Reshef et al., 1970). En adipocitos, la PEPCCK-C también está regulada positivamente por ácidos grasos libres, en especial ácidos grasos de cadena larga monoinsaturados y poliinsaturados (Antras-Ferry et al., 1994; Forest et al., 1997). Éstos actúan sobre el promotor de la PEPCCK-C a través del factor de transcripción PPAR γ , al igual que las tiazolidinedionas (Cadoudal et al., 2005; Duplus et al., 2003).

2.6.2. Función lipolítica del adipocito.

Dada la necesidad de energía para el resto de tejidos del organismo, durante el ayuno se produce la degradación de los triglicéridos almacenados en el adipocito mediante la lipólisis. La lipólisis consiste en la hidrólisis de la molécula de triglicérido hasta sus dos componentes, el glicerol y los ácidos grasos libres. La reacción limitante de la lipólisis está controlada principalmente por las enzimas triacilglicerol lipasas. La lipasa sensible a hormonas (HSL) es la principal responsable de la regulación de la lipólisis estimulada/inhibida por hormonas, aunque no la única (Raben and Baldassare, 2005). La HSL cataliza la hidrólisis de los triglicéridos hasta monoglicéridos, molécula formada por una cadena de ácido graso junto con el "esqueleto" del glicerol. Finalmente, los monoacilgliceroles o monoglicéridos son hidrolizados por la monoacilglicerol lipasa, liberando así todos los ácidos grasos del glicerol. Tras la lipólisis, tanto el glicerol como los FFAs difunden hasta la circulación sanguínea, abasteciendo de sustratos energéticos al resto de tejidos. Los FFAs circulantes son captados por el hígado y especialmente el músculo esquelético, y posteriormente oxidados hasta CO_2 para obtener energía. Durante el ayuno, un 40% de los FFAs captados por el hígado es convertido en CO_2 , y en cuerpos cetónicos que son liberados a la circulación como otra fuente energética para tejidos periféricos. Sin embargo, el 60% restante es reesterificado a triglicéridos a través de la gliceroneogénesis hepática y la fosforilación del glicerol captado por la glicerol quinasa hepática. Estos triglicéridos producidos en hígado son empaquetados en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y liberados nuevamente a la circulación sanguínea para su transporte hacia el tejido adiposo y el músculo (Figura 7). De esta forma, el tejido adiposo vuelve a almacenar el posible excedente de FFAs liberados durante el ayuno que no hayan sido captados y oxidados por los tejidos periféricos (Beale et al., 2004).

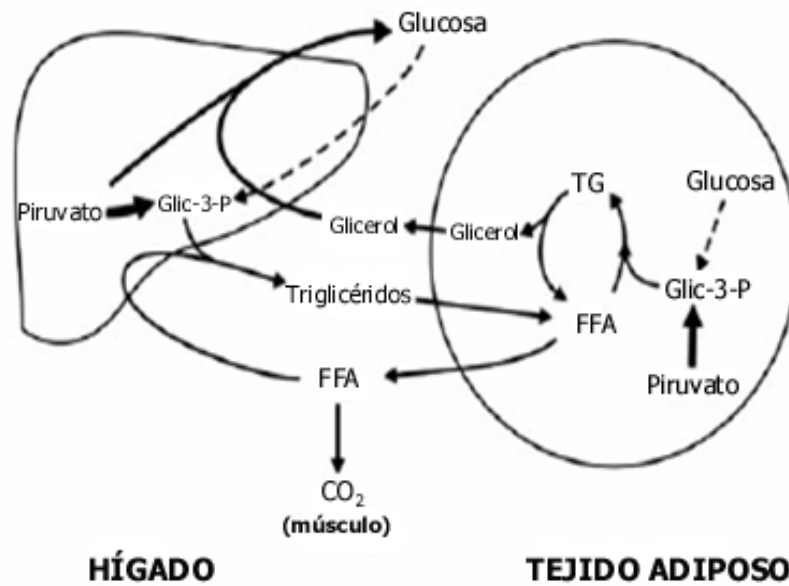


Figura 7. Ciclo de los ácidos grasos libres/triglicéridos entre el tejido adiposo blanco y el hígado durante el ayuno. FFA: Ácidos grasos libres; Glic-3-P: Glicerol-3-fosfato; TG: triglicéridos. Fuente: modificado de Reshef L et al., J Biol Chem 2003 (Reshef et al., 2003).

2.6.3. Función termogénica del adipocito marrón.

El mantenimiento de la temperatura corporal es vital para la supervivencia de las especies mamíferas. Los más sensibles a la pérdida de calor son los mamíferos de menor tamaño, como los roedores y las crías mamíferos más grandes. La presencia del tejido adiposo marrón es crítica en estos casos, e irá desapareciendo a lo largo de la vida adulta en las especies de mayor tamaño. El músculo esquelético y el tejido adiposo marrón son los principales órganos responsables de la producción de calor o termogénesis. A nivel muscular existe un tipo de termogénesis inducida por el frío, la termogénesis dependiente de los escalofríos (*shivering thermogenesis*). Sin embargo, el tejido adiposo marrón es el principal responsable de la termogénesis adaptativa o termogénesis independiente de los escalofríos (*non-shivering thermogenesis*). Esta capacidad termogénica única del tejido adiposo marrón está determinada por la presencia de la proteína desacopladora 1 (UCP1) (Cannon and Nedergaard, 2004; Rosen and Spiegelman, 2000; Sell et al., 2004; Valverde et al., 2005).

La cadena respiratoria está formada por un conjunto de proteínas localizadas en la membrana mitocondrial interna (Figura 8). Estos complejos proteicos son los encargados de aceptar los electrones generados durante la degradación de los sustratos energéticos, transportados por el NADH y FADH₂, hasta su aceptor final, el O₂ (fosforilación oxidativa). A lo largo de la cadena respiratoria, el transporte de electrones es acoplado al bombeo de protones (H⁺) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, creando así un gradiente electroquímico de H⁺. Este gradiente es utilizado por la enzima ATP sintasa para formar ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico. UCP1 se localiza en la membrana mitocondrial interna de las mitocondrias de los adipocitos marrones. Su función es la de disipar el gradiente electroquímico de H⁺, al transportar protones desde el espacio intermembranal a la matriz mitocondrial para generar calor, desacoplándolo de la síntesis de ATP (Figura 8).

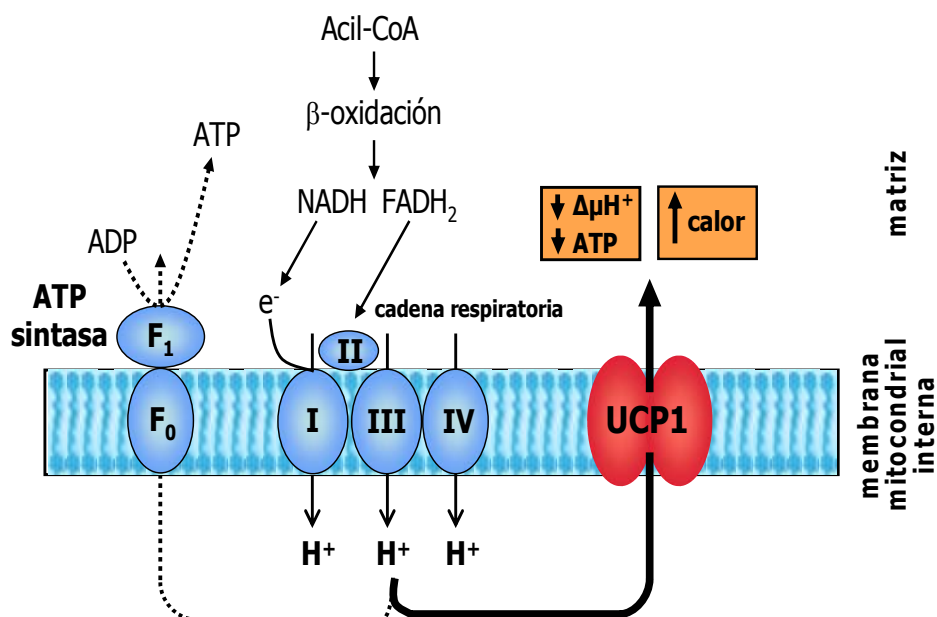


Figura 8. UCP1 y la cadena respiratoria. La proteína UCP1 se localiza en la membrana mitocondrial interna donde desacopla la oxidación de sustratos de la síntesis de ATP. En este caso, el sustrato energético es la β-oxidación de ácidos grasos. Fuente: modificado de Sell H et al., Int J Biochem Cell Biol 36, pp2098-2104 (2004) (Sell et al., 2004).

2.6.3.1. Regulación de la termogénesis en tejido adiposo marrón.

La presencia de UCP1 provoca la disminución de la eficiencia energética de la cadena respiratoria, determinada como la síntesis ATP a partir de sustratos energéticos. Por ello, el tejido adiposo marrón se activa *in vivo* bajo circunstancias particulares, como la exposición al frío, la ingestión de dietas con alto contenido lipídico y durante el periodo perinatal (Valverde et al., 2005). La expresión de UCP1 está regulada a nivel transcripcional por PPAR γ y su coactivador PGC-1 α (Puigserver et al., 1998), aunque PPAR δ también promueve su expresión. La termogénesis y la expresión de UCP1 en tejido adiposo marrón está mediada por el Sistema nervioso simpático mediante la liberación de noradrenalina (NA) (Sell et al., 2004). La NA regula la proliferación y la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos marrones a través de los receptores β -adrenérgicos que expresan, β_1 y β_3 (Cannon and Nedergaard, 2004). Además, la estimulación de los receptores β_3 -adrenérgicos por la NA activa la lipólisis. El incremento de FFAs no sólo incrementa la termogénesis por mayor disponibilidad de sustrato, sino que también actúa incrementando la actividad UCP1 (Sell et al., 2004). La activación crónica de los receptores β_3 -adrenérgicos puede incluso inducir la aparición de adipocitos marrones en depósitos de tejido adiposo blanco (Cinti, 2005; Rosen and Spiegelman, 2000). La sobrealimentación con dietas altas en lípidos también lleva a la activación del tejido adiposo marrón, como un mecanismo compensatorio al incremento de la ingesta energética denominado termogénesis inducida por la dieta (Cannon and Nedergaard, 2004; Portillo et al., 1998; Rippe et al., 2000; Rothwell and Stock, 1979). A diferencia del adipocito blanco, el marrón acumula lípidos como almacén de ácidos grasos, principal sustrato para su capacidad termogénica (Rousset et al., 2004). Gracias a UCP1, el tejido adiposo marrón es capaz de oxidar sustratos rápidamente para producir calor sin incrementar la síntesis de ATP y no almacenarlos. Por ello, el tejido adiposo marrón tiene una importantísima implicación en el metabolismo lipídico, regulando la cantidad de lípidos corporales al poder “quemarlos” y no acumulándolos.

2.6.4. Función secretora del adipocito blanco y marrón.

En tan sólo una década, el adipocito se ha convertido en uno de los tipos celulares que secreta más proteínas. Estas proteínas actúan como hormonas con acciones autocrinas, paracrinas o endocrinas y son conocidas con el nombre genérico de adipoquinas o adipocitoquinas. Las adipoquinas son capaces de regular la secreción y la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa y de los lípidos en otros tejidos, el balance energético corporal e incluso el sistema inmunitario y la función reproductiva (Mora and Pessin, 2002). El tejido adiposo blanco se considera un gran órgano secretor, por la variedad de adipoquinas que secreta, por su contribución a la masa corporal y por su amplia distribución. Sin embargo, el tejido adiposo marrón se encuentra distribuido de forma restringida y representa un pequeño tamaño corporal. Por este motivo, se cree que la capacidad secretora del adipocito marrón es menos importante que la del blanco (Cannon and Nedergaard, 2004). Se ha descrito un amplio listado de proteínas expresadas y secretadas por el tejido adiposo. En algunos casos no se ha demostrado su expresión y secreción por el adipocito, aunque sí en macrófagos y células de soporte presentes en el tejido adiposo. Los niveles circulantes de algunas de ellas se encuentran alterados en la obesidad y resistencia a la insulina, indicando un posible papel en el desarrollo o prevención de la diabetes de tipo 2 y otras complicaciones asociadas a la obesidad.

2.6.4.1. Leptina.

La leptina fue la primera adipoquina descrita (Zhang et al., 1994) y descubrió al adipocito como una célula secretora capaz de modular el metabolismo corporal. Mutaciones en el gen de la leptina, gen *ob*, o en su receptor, gen *OB-R* o *db*, desencadenan la aparición de obesidad mórbida y diabetes en ratones jóvenes, junto con una disminución del gasto energético, hiperfagia e infertilidad (Ingalls et al., 1950). La leptina es una proteína secretable producida específicamente por los adipocitos blancos, aunque se han detectado bajos niveles

de expresión en músculo esquelético, placenta, cerebro, epitelio gástrico y mamario (Ahima and Flier, 2000), incluso en tejido adiposo marrón (Cinti, 2002). De hecho, un incremento en la expresión de leptina por el adipocito marrón es considerado un signo de inactividad y de transdiferenciación hacia el blanco (Cinti, 2005). Los niveles circulantes de leptina se correlacionan directamente con la masa de tejido adiposo (Maffei et al., 1995). Aunque todos los depósitos de grasa la expresan, existen diferencias en los niveles de expresión según su localización, estado del desarrollo y especie (Trayhurn et al., 1995; Trayhurn and Beattie, 2001). Se puede diferenciar dos principales lugares de acción de la leptina: el Sistema nervioso central (SNC), principal tejido diana, y los tejidos periféricos. A nivel del SNC, la leptina inhibe las neuronas productoras del neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con el gen *agouti* (ARGP), ambos neuropéptidos orexigénicos. Además, la leptina estimula las neuronas productoras de proopiomelanocortina (POMC) y el péptido inducible por cocaína (CART), neuropéptidos anorexigénicos (Miner, 2004; Stephens et al., 1995). Por tanto, la leptina ejerce un papel regulador negativo de la ingesta de alimentos. A través del hipotálamo, la leptina también es capaz de estimular al sistema nervioso simpático (SNS), induciendo cambios en el gasto energético y el depósito de grasa en los tejidos, de forma independiente a la expresión de su receptor (Collins et al., 1996; Haynes et al., 1997). También se han descrito efectos directos de la leptina sobre tejidos periféricos como la célula β pancreática, hígado, músculo e incluso el propio adipocito (Fasshauer and Paschke, 2003). Los efectos de la leptina en estos tejidos periféricos son debidos a la activación de la proteína quinasa activada por el AMP (AMPK) (Lafontan, 2005; Minokoshi et al., 2002). La lipotoxicidad se define como los efectos adversos causados por el depósito de grasa ectópico, es decir, en aquellos tejidos no adiposos, como hígado, músculo esquelético y cardíaco e islotes pancreáticos (Lee et al., 1994). La leptina disminuye los niveles de SREBP-1c (Shimomura et al., 1999) e incrementa los niveles de PGC-1 α (Kakuma et al., 2000) y de PPAR α (Lee et al., 2002). De este modo, la leptina incrementa la oxidación de ácidos grasos y disminuye la lipogénesis en tejidos periféricos para prevenir el efecto lipotóxico del acúmulo de grasa

intracelular (Unger, 2003). Otro aspecto importante referente a la acción de la leptina es la posibilidad de que aparezca una resistencia a la leptina, tanto a nivel central como periférico (Unger, 2003).

2.6.4.2. Adiponectina.

La adiponectina (o Acrp30, ApM1, AdipoQ, GBP28) es otra de las adipoquinas más importantes que secreta el adipocito (Scherer et al., 1995). Se trata de una proteína de 30 kDa que presenta homología con el factor del complemento C1q y se expresa específicamente tanto en el tejido adiposo murino como humano (Scherer et al., 1995). Además de expresarse en grandes cantidades en el tejido adiposo, se encuentra en gran cantidad en el suero representando hasta el 0.05% de las proteínas séricas. La administración de adiponectina reduce los niveles séricos de glucosa, FFAs y triglicéridos (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). Los principales tejidos diana para la adiponectina son el músculo esquelético y el hígado. La adiponectina incrementa la captación de glucosa y la oxidación de los FFAs a través de la activación de la AMPK en músculo esquelético (Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002). A nivel hepático, la adiponectina incrementa la sensibilidad a la insulina, disminuyendo la síntesis de glucógeno. A diferencia de otras adipoquinas, los niveles de adiponectina circulante están disminuidos en la obesidad humana y murina (Arita et al., 1999; Hu et al., 1996). Además, la pérdida de peso en personas obesas incrementa la sensibilidad a la insulina, tras la recuperación de los niveles circulantes de adiponectina (Bruun et al., 2003; Lihn et al., 2004). Por tanto, la adiponectina es una adipoquina que incrementa la sensibilidad a la insulina a través de sus efectos sobre los tejidos periféricos.

2.6.4.3. Factor- α de necrosis tumoral.

El adipocito produce factor- α de necrosis tumoral (TNF- α), citoquina expresada y secretada especialmente por células del sistema inmunitario. Se ha descrito un incremento en su expresión y secreción por el tejido adiposo, y el músculo esquelético, en modelos murinos

de obesidad (Hotamisligil et al., 1993; Moller, 2000; Sethi and Hotamisligil, 1999) y su reducción mejora la sensibilidad a la insulina (Hotamisligil et al., 1993; Uysal et al., 1997). En humanos, también se ha correlacionado un incremento en sus niveles séricos con la obesidad, la hiperinsulinemia y la disminución de la sensibilidad a la insulina (Kern et al., 1995; Kern et al., 2001). Sin embargo, la expresión de TNF- α en el tejido adiposo de humanos es baja, siendo los macrófagos sus principales productores. Por este motivo, al menos en roedores, TNF- α es un importante regulador de la sensibilidad a la insulina, siendo no tan claro en humanos (Sethi and Hotamisligil, 1999). La estimulación de sus receptores afecta a la cascada de señalización de la insulina, reduciendo la sensibilidad a la hormona (Liu et al., 1998). Además, TNF- α tiene efectos autocrinos/paracrinos sobre el adipocito, modulando su metabolismo, su secreción de adipoquinas y su diferenciación (Xu et al., 2002a; Xu et al., 2002b). TNF- α activa la lipólisis e inhibe la enzima lipoproteína lipasa (LPL), la expresión de transportadores de ácidos grasos y la lipogénesis (Sethi and Hotamisligil, 1999). Por tanto, TNF- α modula la señalización de la insulina e incrementa los lípidos circulantes, contribuyendo a la hiperlipidemia asociada a la obesidad y a la resistencia a la insulina.

2.6.4.4. Interleuquina-6.

Aproximadamente el 30% de la interleuquina-6 (IL-6) circulante es producida por el tejido adiposo blanco (Mohamed-Ali et al., 1997). IL-6 es una citoquina proinflamatoria cuyos niveles plasmáticos se encuentran incrementados en la resistencia a la insulina y la obesidad, tanto en modelos murinos como en humanos (Vozarova et al., 2001). Es más, sus niveles basales se utilizan para predecir el riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2 (Pickup et al., 1997; Pradhan et al., 2001). A nivel hepático, la administración de IL-6 induce la gluconeogénesis (Tsigos et al., 1997) y la secreción de triglicéridos (Nonogaki et al., 1995; Tsigos et al., 1997), e inhibe la síntesis de glucógeno inducida por la insulina (Rotter et al., 2003; Senn et al., 2002). Además, IL-6 es capaz de inhibir directamente la señalización de la insulina en adipocitos y hepatocitos (Rotter et al., 2003; Senn et al., 2002).

3. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.

La glucosa es la principal fuente de energía para las células, siendo su concentración sanguínea esencial para la supervivencia de los organismos superiores. La regulación de la normoglucemia es fundamental, ya que tanto la aparición de periodos de hipoglucemia como de hiperglucemia severa afectan seriamente a la supervivencia. En esta regulación principalmente están implicadas la insulina y el glucagón, dos hormonas secretadas por el páncreas (DeFronzo, 1997; Unger, 1991). Ambas hormonas son claves en el control de la utilización y la producción de glucosa por los tejidos. Durante el ayuno, la captación de glucosa se produce principalmente en los tejidos no dependientes de insulina, especialmente el cerebro. La falta de insulina y el aumento del glucagón, junto con otros factores hormonales y nerviosos, mantienen la normoglucemia durante el ayuno a través de un incremento en la producción de glucosa, principalmente hepática. Este incremento en la producción hepática de glucosa se produce mediante la estimulación de la gluconeogénesis y la glucogenolisis, asegurando la captación basal de glucosa por el cerebro (Bajaj and DeFronzo, 2003). Sin embargo, durante el periodo postprandial, la homeostasis de la glucosa depende básicamente de tres procesos que ocurren simultáneamente. Tras la ingesta, se produce una hiperglucemia transitoria que estimula la producción y secreción de insulina por las células β pancreáticas. El incremento en los niveles circulantes de insulina, junto con la hiperglucemia transitoria, induce la captación de glucosa por el hígado y, especialmente, por los tejidos periféricos, músculo esquelético y tejido adiposo. El 80-85% de la captación de glucosa estimulada por la insulina se produce en el músculo, mientras que el tejido adiposo puede ser responsable de hasta el 15%. Por último, la inhibición de la secreción de glucagón por las células α pancreáticas, inducida por la insulina, suprime la producción hepática de glucosa. Pero además, la insulina tiene importantes acciones a nivel del SNC y el tejido adiposo. El SNC procesa toda la información que recibe de los tejidos periféricos sobre el estado nutricional del organismo, a través de la insulina y otras hormonas como la leptina, e incluso a través de nutrientes. De

este modo, el SNC controla el balance energético regulando la ingesta de alimentos, el gasto energético de los tejidos periféricos e incluso la producción hepática de glucosa (Schwartz and Porte, Jr., 2005). La insulina no sólo estimula la captación de glucosa por el tejido adiposo sino que también tiene un potente efecto antilipolítico y lipogénico (Bajaj and DeFronzo, 2003).

La utilización de la glucosa como fuente de energía para las células requiere primeramente su transporte hacia el interior. Una vez allí, las hexoquinas la fosforilan a glucosa-6-fosfato. La fosforilación de la glucosa permite su utilización a través de las distintas vías metabólicas, como la glucólisis y la vía de las pentosas, o incluso su almacenamiento en forma de glucógeno o lípidos.

3.1. LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA.

El transporte de glucosa a través de la membrana plasmática está mediado por dos grandes familias de proteínas de membrana: la familia de los cotransportadores de glucosa dependientes de sodio (SGLTs) y la familia de los transportadores de azúcares independientes de sodio (SLC2A o GLUTs) (Joost and Thorens, 2001;Wright, 2001). Los SGLTs transportan glucosa y galactosa mediante transporte activo, acoplado la entrada de sodio a la entrada contragradiante de glucosa, en la luz del intestino delgado y túbulo proximal renal. Sin embargo, los GLUTs se expresan en todas las células y transportan azúcares, principalmente glucosa, a través de la membrana plasmática mediante transporte facilitado a favor de gradiente. Esta familia engloba varios miembros, GLUT1-GLUT12 y el transportador de mioinositol acoplado al transporte de protones (HMIT), clasificados en tres clases según la similitud de secuencias y sus características (Joost and Thorens, 2001). Mientras que las clases II y III no han sido tan estudiadas, la clase I (GLUT1-4) es la más conocida y caracterizada. La distribución y función de los transportadores de glucosa de clase I se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1).

Isoforma	Distribución tisular	Función
GLUT1	Eritrocitos, cerebro, riñón, placenta, colon (ubigua)	Captación basal de glucosa
GLUT2	Hígado páncreas (células β) intestino, riñón	Entrada y salida de glucosa "Sensor de la glucosa" Transporte glucosa absorbida a la sangre
GLUT3	Cerebro	Captación de glucosa (alta afinidad)
GLUT4	Corazón, músculo, WAT, BAT, cerebro	Captación de glucosa estimulada por insulina

Tabla 1. Transportadores de glucosa de clase I. Distribución y función de los distintos miembros de la clase I de la familia de los transportadores de glucosa GLUTs.

3.2. LAS HEXOQUINASAS.

En la mayoría de las vías de metabolización de la glucosa, siendo la vía clásica de la glucólisis la de mayor importancia, la primera reacción consiste en la fosforilación de la glucosa, dependiente de ATP, a glucosa-6-fosfato. Esta reacción está catalizada por una familia de enzimas, las hexoquinasas (HK):



En los tejidos de mamíferos podemos encontrar cuatro hexoquinasas diferentes, codificadas por cuatro genes independientes, denominadas hexoquinasas de tipo I-IV o hexoquinasas A-D, respectivamente (Gonzalez et al., 1964; Katzen and Schimke, 1965). Una característica común a las cuatro isoenzimas es su capacidad para utilizar los mismos sustratos, ya sea glucosa, manosa, fructosa o 2-deoxiglucosa, aunque la glucosa sea su

principal sustrato fisiológico. Las cuatro isoenzimas pueden ser divididas en dos grupos, tanto por sus características cinéticas como por su tamaño: las hexoquinasas con alta afinidad por la glucosa (HKI, HKII y HKIII) y la hexoquinasa de baja afinidad por la glucosa (glucoquinasa). Las hexoquinasas de alta afinidad presentan un tamaño molecular similar entre ellas, de aproximadamente 100 kDa, muy distinto del de la glucoquinasa, cuyo tamaño es aproximadamente la mitad (50kDa).

3.2.1. Las hexoquinasas I-III.

Las hexoquinasas HKI-III presentan una K_m para la glucosa muy baja, 0.04 mM, 0.13 mM y 0.02 mM, respectivamente. Además, estas tres hexoquinasas son susceptibles de ser inhibidas por el producto final de la reacción que catalizan, la glucosa-6-fosfato (G6P). La hexoquinasa I (HKI) o isoenzima del cerebro se expresa en todos los tejidos, aunque principalmente en cerebro y su expresión no parece estar afectada ni hormonalmente ni por otros cambios fisiológicos. La hexoquinasa II (HKII), o isoforma inducible por la insulina, se expresa principalmente en aquellos tejidos que responden a la insulina, como el músculo esquelético y el tejido adiposo, aunque también en hígado y glándula mamaria (Sebastian et al., 2001). La expresión de HKII se encuentra regulada por hormonas, como la insulina, y otros cambios en el estado fisiológico como son la hipoxia y el ejercicio (Cusi et al., 2001; Vogt et al., 2000). Por último, la hexoquinasa III (HKIII) se expresa mayoritariamente en células blancas sanguíneas, detectándose también en bazo, pulmones y páncreas.

3.2.2. La hexoquinasa IV o glucoquinasa.

Las características cinéticas de la glucoquinasa (GK) distan del resto de hexoquinasas de mamíferos. La glucoquinasa muestra una baja afinidad por la glucosa al presentar una K_m mucho mayor que la del resto de HK, alrededor de 8 mM en humanos y entre 3-9 mM en diferentes mamíferos. Además, la glucoquinasa muestra cooperatividad con la glucosa y la manosa, pero no con la fructosa o la 2-deoxiglucosa. Otra de las características cinéticas de la glucoquinasa es su ausencia de inhibición por su producto final, la G6P. Existe un punto de inflexión en la reacción catalizada por la GK muy próximo a una concentración de glucosa de 4 mM. En este punto, la glucoquinasa presenta su máxima sensibilidad a cambios producidos en la concentración del sustrato. Tanto roedores como humanos mantienen una glucemia muy próxima a 5 mM, respondiendo rápidamente a pequeñas fluctuaciones para mantener estos niveles constantes. La proximidad de estos niveles de glucosa a la máxima sensibilidad de la enzima al sustrato, convierte a la glucoquinasa en el elemento clave en la homeostasis de la glucosa.

La glucoquinasa se expresa principalmente en hepatocitos y en células de origen neural/neuroendocrino. Entre las células de origen neural/neuroendocrino encontramos: principalmente células β pancreáticas, células α pancreáticas, células intestinales de tipo L y K, y ciertas neuronas del SNC, especialmente localizadas en hipotálamo. El gen de la glucoquinasa es único, aunque contiene dos promotores diferentes que permiten una expresión diferencial y una regulación transcripcional específica de tejido. La expresión específica de la GK en hígado está controlada por el promotor de la región más cercana al inicio de la transcripción, promotor "*downstream*". Mientras, la expresión específica en células neurales/neuroendocrinas sensibles a la glucosa, la célula β es la más estudiada y típica, está controlada por el promotor "*upstream*" situado en una región más alejada. Además de esta regulación específica de tejido a través de dos promotores distintos, la actividad de la enzima

también sufre una regulación específica de tejido, bien sean hepatocitos o bien células β pancreáticas.

3.2.2.1. Regulación de la glucoquinasa en hepatocitos.

El hígado ejerce un papel central en la homeostasis y el metabolismo de la glucosa, siendo capaz de utilizarla o producirla, alternativamente. Por sus características cinéticas y por su fuerte control de la regulación de la glucólisis, la GK facilita la utilización de la glucosa y la síntesis de glucógeno por el hígado, en periodos de hiperglucemia o tras la ingestión de alimento. Existe una fuerte regulación de su expresión y actividad en hepatocitos. Esta regulación se realiza principalmente a través de dos mecanismos: una regulación transcripcional y una regulación post-traducciona. El promotor específico para la expresión de GK en hepatocitos contiene secuencias de unión a diversos factores de transcripción. Entre estos transactivadores se encuentran: factores nucleares hepáticos (HNF-1, HNF-3 β , HNF-4 y HNF-6), factores estimuladores proximales (UPS), transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5), C/EBPs y SREBP-1c. La expresión de GK ocurre en el momento en que se produce el cambio de alimentación materna a la adulta. SREBP-1c es el principal responsable de la regulación transcripcional de la GK hepática según la disponibilidad de nutrientes, a través de la regulación de la insulina y glucagón sobre este factor. La insulina incrementa la transcripción de SREBP1c, induciendo la expresión de GK, mientras que el glucagón, a través del cAMP, antagoniza el efecto de la insulina. A nivel post-transcripcional, la principal regulación de la actividad GK en hígado se produce a través de su proteína reguladora (GKRP). GKRP se expresa principalmente en hígado, aunque se detecta en pulmones, neuronas del núcleo paraventricular (hipotálamo) y en islotes pancreáticos, donde su importancia fisiológica no está clara. La GKRP es capaz de formar un complejo con la GK e inactivarla. Además de ser competitiva con respecto a la glucosa, esta asociación se regula a través de dos moléculas del metabolismo intermediario, la fructosa-1-fosfato (F1P) y la fructosa-6-fosfato (F6P). Tanto la F1P como la F6P se unen a la GKRP en el mismo lugar, de

forma competitiva. Así, la unión de la F6P a la GKRK permite su asociación con la GK, inhibiendo por tanto la actividad GK. Sin embargo, la unión de F1P a la GKRK evita la formación del complejo GK-GKRK, permitiendo que la GK sea activa. Es más, la GKRK también influye en la localización celular de la GK. Mientras que la GK es una enzima citoplasmática, la GKRK es una proteína mayoritariamente nuclear, aunque se detecta una pequeña proporción citoplasmática. De esta forma, la GK queda retenida en el núcleo por la GKRK, evitando además su degradación en aquellas condiciones que favorecen la formación del complejo, como la baja concentración de glucosa y la ausencia de fructosa. Las condiciones desfavorables para la formación del complejo GK-GKRK son la alta concentración de glucosa y presencia de fructosa, mediada por la concentración de F1P. En estas condiciones, la GK queda liberada de la GKRK y es exportada al citoplasma, donde realiza su actividad catalítica. Existen otras proteínas que interaccionan con la GK pudiendo modular su actividad, como la propionilCoA carboxilasa y la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/ fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK/FBPasa) (Argaud et al., 1995; Massa et al., 2004). Incluso los ácidos grasos de cadena larga también son capaces de inhibir específicamente la actividad GK (Tippett and Neet, 1982). Finalmente, la GK puede ser fosforilada/desfosforilada, inhibiendo o incrementando su actividad respectivamente (Munoz-Alonso et al., 2000).

3.2.2.2. Regulación de la glucoquinasa en célula β .

La GK forma parte del llamado "sensor de la glucosa" (*glucose sensor*) en aquellas células sensibles a cambios en la concentración sanguínea de glucosa, como las células β del páncreas. En estas células, la secreción de insulina estimulada por glucosa está predominantemente determinada por el metabolismo del azúcar. Gracias a la GK, la célula β puede responder al incremento en la glucemia secretando insulina para mantener los niveles séricos de glucosa constantes. La regulación de la GK en las células β del páncreas también se realiza a través de una regulación transcripcional y una regulación post-transcripcional. El promotor específico para la expresión de GK en células β contiene secuencias reconocidas por

factores de transcripción involucrados en la diferenciación del páncreas (Zhang et al., 2005). También se ha descrito un lugar de unión para PPAR γ . Además, la transcripción del gen está incrementada por insulina, lactógeno fetal, biotina y ácido retinoico. A diferencia del hepatocito, el aumento del cAMP producido por el péptido-1 similar al glucagón (GLP1) incrementa la expresión de GK en célula β . Otra diferencia respecto a los hepatocitos es que, a pesar de la presencia de la GKRP en islotes pancreáticos, la actividad GK no viene modulada por ella. En este tipo celular, la GK se asocia a los gránulos de insulina de forma dinámica, y esta asociación altera tanto su actividad como su conformación (Rizzo et al., 2002; Stubbs et al., 2000; Toyoda et al., 1999). La unión de la GK a gránulos de insulina, a bajas concentraciones de glucosa, la protege de su degradación y actúa como reservorio (Rizzo et al., 2002; Stubbs et al., 2000; Toyoda et al., 1999). La GK pancreática también se asocia a la PFK-FBPasa, donde puede tener más relevancia en su regulación post-transcripcional que en el hígado.

III. OBJETIVOS.

La producción de glicerol-3-fosfato por el adipocito es fundamental para la esterificación de los ácidos grasos libres y el depósito de lípidos. Esto sugiere que un aumento en la síntesis de glicerol-3-fosfato por el adipocito podría incrementar su capacidad de almacenar lípidos induciendo obesidad, resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2. Se considera que en condiciones fisiológicas, el adipocito obtiene glicerol-3-fosfato a partir de la glucosa durante el periodo post-prandial, o a partir de precursores gluconeogénicos, como el piruvato, durante el ayuno. Por tanto, ***el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar si alteraciones metabólicas primarias en el tejido adiposo que incrementen la obtención del glicerol-3-fosfato pueden desencadenar obesidad y diabetes de tipo 2.***

Para ello, este objetivo general se dividió en los siguientes ***objetivos concretos***:

1. Estudiar el efecto de un incremento de la gliceroneogénesis en tejido adiposo en el desarrollo de la obesidad y de la resistencia a la insulina.

1.1. Generar ratones transgénicos que sobreexpresen en tejido adiposo la principal enzima reguladora de esta vía, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, y estudiar los cambios metabólicos asociados a dicha sobreexpresión.

1.2. Estudiar si el incremento en la reesterificación de ácidos grasos por el tejido adiposo puede proteger de la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en lípidos.

2. Estudiar el efecto de un incremento de la captación de glucosa en tejido adiposo en la producción de glicerol-3-fosfato, la obesidad y la resistencia a la insulina.

2.1. Generar ratones transgénicos que expresen glucoquinasa en tejido adiposo y estudiar los cambios metabólicos asociados a dicha expresión.

2.2. Estudiar si el incremento en la utilización basal de glucosa por el tejido adiposo puede llevar a un mayor depósito de grasa y por tanto a obesidad.

IV. RESULTADOS.

PARTE I:

**EFFECTO DEL INCREMENTO DE LA
GLICERONEOGÉNESIS EN TEJIDO ADIPOSO EN EL
DESARROLLO DE OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA
INSULINA**

1.1. OBTENCIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESEN PEPCK EN TEJIDO ADIPOSO.

A fin de estudiar si un incremento en la actividad PEPCK en el tejido adiposo llevaba a un aumento de la gliceroneogénesis y a un incremento de la reesterificación de ácidos grasos y del depósito de grasa, se obtuvo un ratón transgénico que expresaba el gen *Pck1* (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*, o PEPCK) de rata específicamente en adipocitos. Para ello, se construyó un gen quimérico donde el gen de la PEPCK estaba bajo el control de un promotor constitutivo y específico de adipocitos, el promotor del gen *Fabp4* (*adipocyte binding protein P2*, también denominado *aP2*). El gen *aP2* codifica una proteína que pertenece a la familia de proteínas intracelulares de unión a lípidos. Esta proteína es específica del tejido adiposo en el que, además de ser muy abundante, se expresa de forma constitutiva (Graves et al., 1992). Por este motivo, el promotor del gen *aP2* ha sido comúnmente utilizado en la manipulación genética del tejido adiposo, a pesar de que en los últimos años también se ha descrito la expresión de la proteína en macrófagos (Makowski et al., 2001).

1.1.1. Construcción del gen quimérico aP2-PEPCK.

El gen quimérico aP2-PEPCK se obtuvo mediante la fusión del promotor del gen *aP2* con el gen *Pck1* de rata. Para ello, un fragmento *ApaI-ApaI* de 6 kb con la secuencia codificante completa y la señal de poliadenilación del gen de la PEPCK de rata (Yoo-Warren et al., 1983), que procedía del plásmido *pB7.0*, se introdujo en la diana *SmaI* del plásmido *pSKII+/prom.aP2*, detrás del promotor del gen *aP2* (Ross et al., 1990). El plásmido resultante se denominó *pSKII+/aP2-PCK1* (Figura 1).

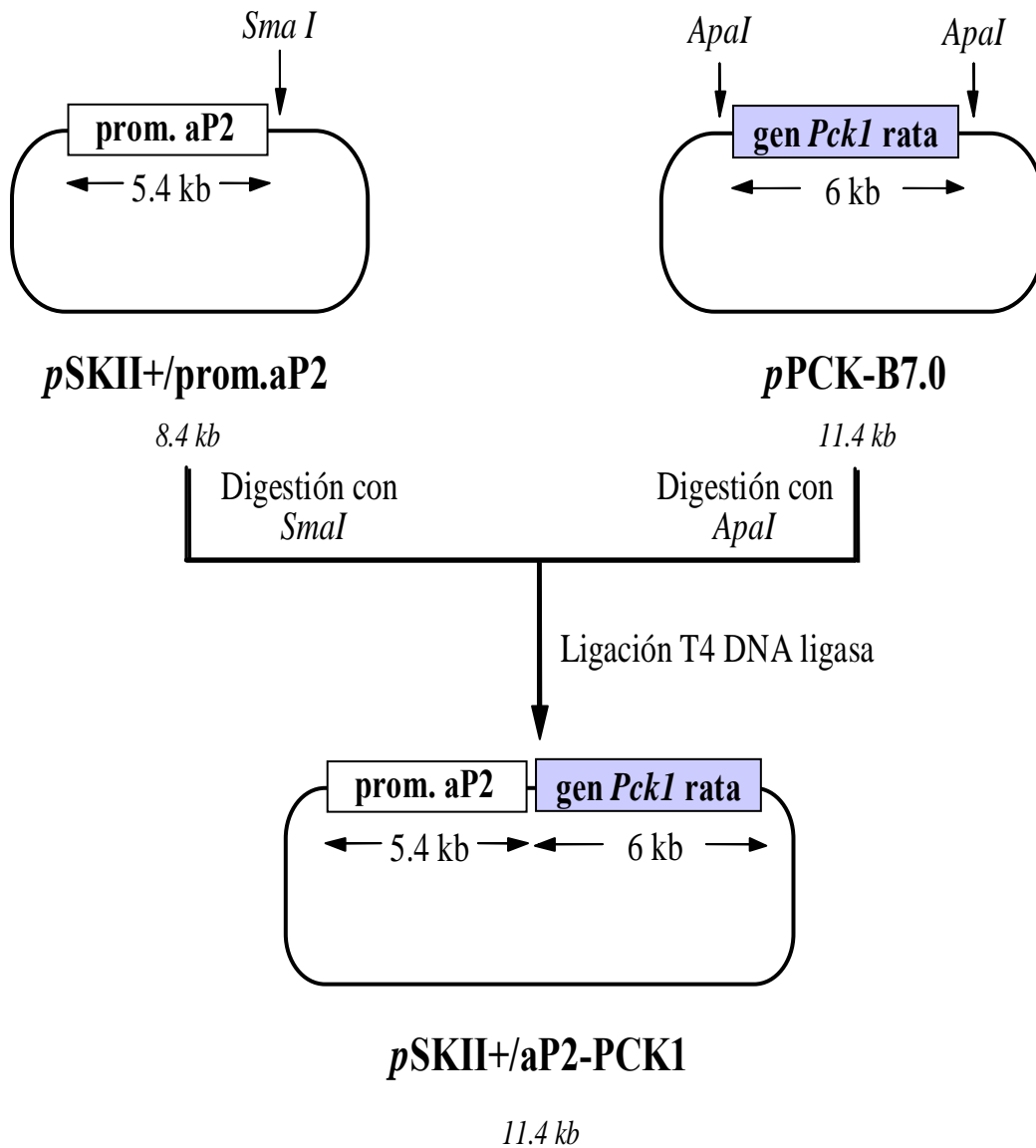


Figura 1. Construcción del plásmido *pSKII+/aP2-PCK1*. El fragmento *ApaI-ApaI* de 6 kb, que contenía la secuencia codificante completa y la señal de poliadenilación del gen *Pck1* de rata, que se encontraba insertado en el plásmido *pB7.0*, se introdujo en la diana *SmaI* del plásmido *pSKII+/prom.aP2*, detrás del promotor del gen *aP2*. Al plásmido resultante se denominó *pSKII+/aP2-PCK1*.

1.1.2. Obtención de los animales transgénicos aP2-PEPCK.

El plásmido *pSKII+/aP2-PCK1* se digirió con las enzimas de restricción *NotI* y *SalI* para obtener el fragmento *NotI-SalI* de 11.4 kb. Este fragmento contenía el promotor del gen *aP2* seguido de la secuencia completa del gen de la PEPCK de rata y su señal de poliadenilación (gen quimérico aP2-PEPCK) (Figura 2). Este gen quimérico se purificó por electroelución y se microinyectó en ovocitos fecundados de ratón B6SJL F1 por el Servei de Biotecnologia Animal de la UAB, asociado a nuestro grupo de investigación. Posteriormente, los embriones microinyectados se transfirieron a hembras receptoras CD-1.

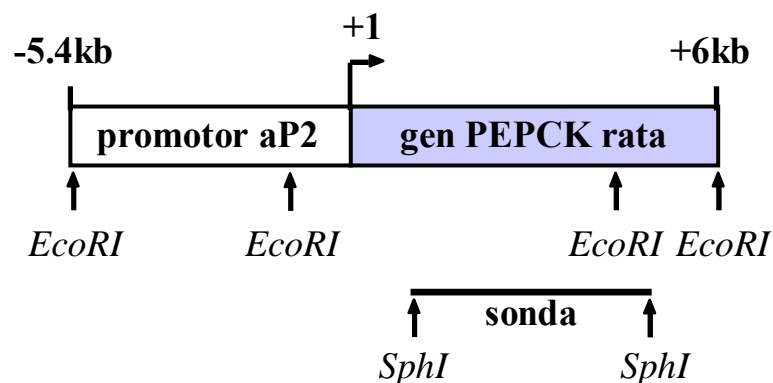


Figura 2. Representación esquemática del gen quimérico aP2-PEPCK. El plásmido *pSKII+/aP2-PCK1* fue digerido con las enzimas de restricción *NotI* y *SalI*. El fragmento de 11.4 kb resultante de esta digestión, el cual contenía el gen quimérico aP2-PEPCK en su totalidad, fue microinyectado a ovocitos fecundados de ratón.

A las tres semanas del nacimiento, el DNA genómico extraído de la cola de los animales se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*, y se analizó por Southern blot la presencia del transgen en los ratones. Tras hibridar con una sonda específica de PEPCK marcada radiactivamente, se detectaron cuatro animales transgénicos. A partir de estos animales, se establecieron cuatro líneas independientes (Tg1-Tg4) de ratones transgénicos aP2-PEPCK. Como puede observarse en la Figura 3, tras la hibridación con la sonda *SphI-SphI* del gen de la PEPCK, los animales heterocigotos presentaban dos bandas específicas del

transgen, de aprox. 6.1 kb y 1.6 kb, además de las dos bandas endógenas presentes en los animales controles (Figura 3).

A partir del cruce de animales fundadores con animales controles C57BL6SJL, se obtuvo la primera generación de animales transgénicos heterocigotos (F1) de las diferentes líneas. A partir de éstos se obtuvieron animales de la segunda generación (F2), los cuales se utilizaron en la realización de este trabajo. Sin embargo, la línea escogida para la continuación de los estudios y la obtención de animales transgénicos aP2-PEPCK homocigotos fue la línea Tg1, ya que presentaba una mayor expresión del transgen y una mayor actividad enzimática PEPCK (Figuras 4,5).

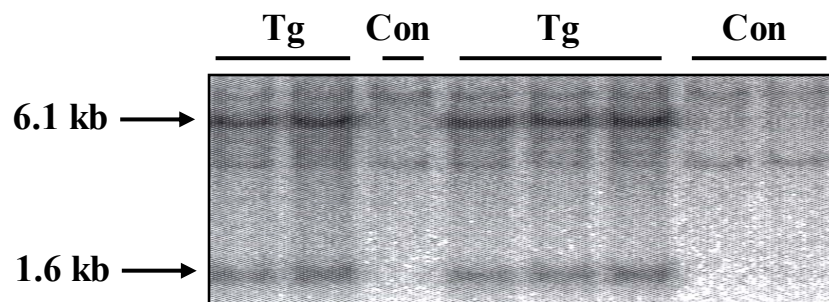


Figura 3. Southern blot representativo de DNA genómico. Análisis por Southern blot del DNA genómico digerido con la enzima de restricción *EcoRI* de ratones controles (**Con**) y transgénicos heterocigotos (**Tg**) de la línea Tg1. La sonda utilizada correspondía al fragmento *SphI-SphI* de 3.85 Kb que contenía parte de la secuencia del gen *Pck1*.

1.1.3. Análisis de la expresión del transgen aP2-PEPCK.

La expresión del mRNA del transgen aP2-PEPCK se analizó en diferentes tejidos. Para ello, se extrajo RNA total de tejido adiposo blanco (WAT), marrón (BAT), hígado y riñón, tanto de animales controles como transgénicos heterocigotos y homocigotos, y se analizó la presencia del transcrito de PEPCK mediante Northern blot. Tanto en animales controles como en transgénicos (heterocigotos y homocigotos) se detectó la presencia del mRNA de 2.8 kb

correspondiente al gen de la PEPCK, transcrito resultante de la expresión tanto del gen de la PEPCK endógeno como del transgen.

En el tejido adiposo blanco (WAT) se observó un incremento de dos veces en la cantidad de mRNA de PEPCK en los animales transgénicos heterocigotos de las líneas Tg2-Tg4 (resultados no mostrados). En cambio, en la línea Tg1 se observó un elevado incremento (más de cinco veces) en la cantidad de mRNA de PEPCK. Además, en el caso de los animales transgénicos homocigotos de la línea Tg1 este incremento era de aproximadamente once veces (Figura 4A y 4B). En el tejido adiposo marrón (BAT) de los animales transgénicos heterocigotos y homocigotos de la línea Tg1 también se observó un incremento en el mRNA de PEPCK de tres y cinco veces, respectivamente (Figura 4A y 4C). No obstante, los niveles de mRNA de PEPCK no estaban alterados en el hígado ni en el riñón de los animales transgénicos (Figura 4A). Este resultado estaba de acuerdo con el hecho de que el promotor *aP2* es específico de tejido adiposo.

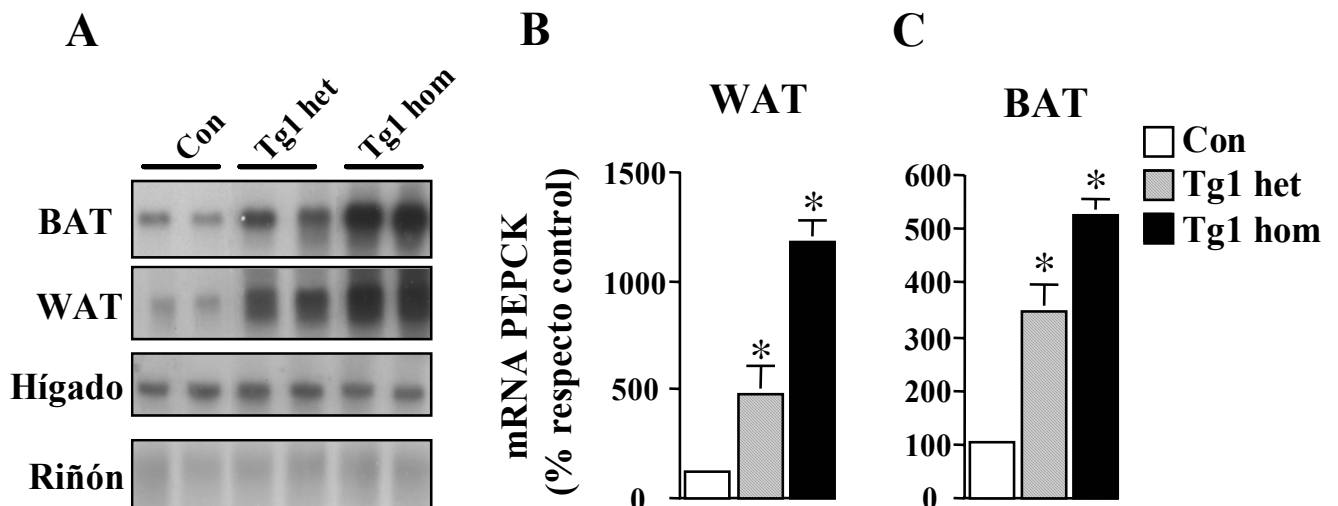


Figura 4. Expresión del transgen en WAT y BAT. (A) Northern blot representativo del tejido adiposo blanco (WAT), tejido adiposo marrón interescapular (BAT), hígado y riñón de ratones ayunados controles (Con) y transgénicos heterocigotos (Tg1 Het) y homocigotos (Tg1 Hom) de la línea 1, hibridado con una sonda específica de PEPCK. (B) y (C) Cuantificación del RNAm de PEPCK en WAT y BAT. Los resultados se representan como medias \pm SE de seis animales. * $P < 0.05$.

1.1.4. Determinación de la actividad enzimática PEPCK en el tejido adiposo.

Se determinó la actividad PEPCK en extractos citosólicos del tejido adiposo blanco epididimal (WAT) para valorar la funcionalidad del transgen α 2-PEPCK. En animales transgénicos heterocigotos alimentados de las líneas Tg2-Tg4 se observó un incremento de dos veces en la actividad PEPCK citosólica del WAT respecto a extractos de animales controles (Figura 5A). En cambio, el incremento en la actividad PEPCK fue mayor (unas 3.5 veces) en los animales transgénicos heterocigotos alimentados de la línea Tg1 (Figura 5A). Cuando se determinó la actividad PEPCK citosólica de extractos de WAT procedentes de animales ayunados, se observó que los animales transgénicos heterocigotos y homocigotos de la línea Tg1 mostraban incrementos en la actividad PEPCK de 4 y 13 veces, respectivamente (Figura 5B). Como era de esperar, no se observaron cambios en la actividad PEPCK hepática en los animales transgénicos heterocigotos y homocigotos (Figura 5B).

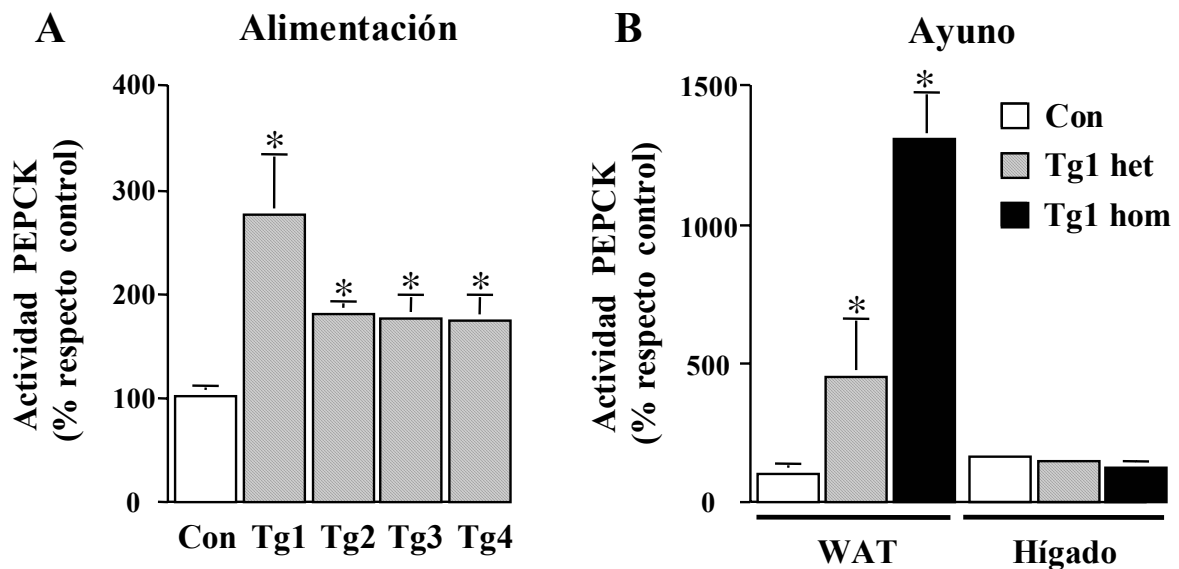


Figura 5. Actividad PEPCK en ratones controles y transgénicos. (A) La actividad PEPCK se determinó en extractos citosólicos de tejido adiposo blanco epididimal obtenidos de animales alimentados. Se analizaron las cuatro líneas de transgénicos heterocigotos (Tg1-Tg4). Los resultados se expresan como porcentajes de la actividad PEPCK en ratones controles (3.9 mU/mg proteína). (B) También se determinó en extractos citosólicos de tejido adiposo blanco e hígado de animales controles (Con) y transgénicos heterocigotos (Tg1 Het) y homocigotos (Tg1 Hom) de la línea Tg1 ayunados. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad PEPCK en WAT de ratones controles ayunados (5.8 mU/mg proteína). Los datos representan la media \pm SE de al menos seis animales por grupo. * $P < 0.05$.

1.2. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN EL TEJIDO ADIPOSO CAUSADAS POR LA SOBREENPRESIÓN DE PEPCK EN DICHO TEJIDO.

En esta parte del trabajo, se estudiaron las posibles alteraciones metabólicas causadas por la sobreexpresión de PEPCK en el tejido adiposo a lo largo del tiempo. Para ello, utilizamos animales machos transgénicos heterocigotos y homocigotos de la línea Tg1.

1.2.1. Análisis del peso corporal, peso del tejido adiposo y contenido de grasa corporal.

En animales machos de seis meses de edad se determinó el peso corporal, el peso del tejido adiposo epididimal y el contenido de grasa corporal. Se detectó un pequeño incremento en el peso corporal de ratones transgénicos heterocigotos, comparado con animales controles hermanos de camada. Sin embargo, este incremento fue más exacerbado en los animales transgénicos homocigotos, ya que presentaban un aumento de aproximadamente un 33% (Figura 6A). Es más, también incrementó significativamente el peso del tejido adiposo gonadal, tanto en animales heterocigotos (un 180%) como en homocigotos (un 340%), en comparación con los animales controles (Figura 6B). Además, cuando se determinó el contenido de grasa corporal, éste había incrementado en un 125% en animales transgénicos heterocigotos y en un 200% en los homocigotos (Figura 6C).

Esto nos indicaba que la ganancia de peso corporal de los animales transgénicos respecto los controles era probablemente debida a un incremento del depósito de grasa. A pesar de ello, la ingesta de alimentos de los animales transgénicos era similar a la de los animales controles (3.3 ± 0.1 , 3.2 ± 0.1 y 3.4 ± 0.1 g/día para controles, Tg1 heterocigotos y homocigotos, respectivamente). En la Figura 7 se puede observar el incremento del depósito de grasa en la cavidad abdominal en los ratones transgénicos. Asimismo, el depósito de tejido adiposo epididimal de un animal transgénico era mayor que el de un animal control (Figura 7).

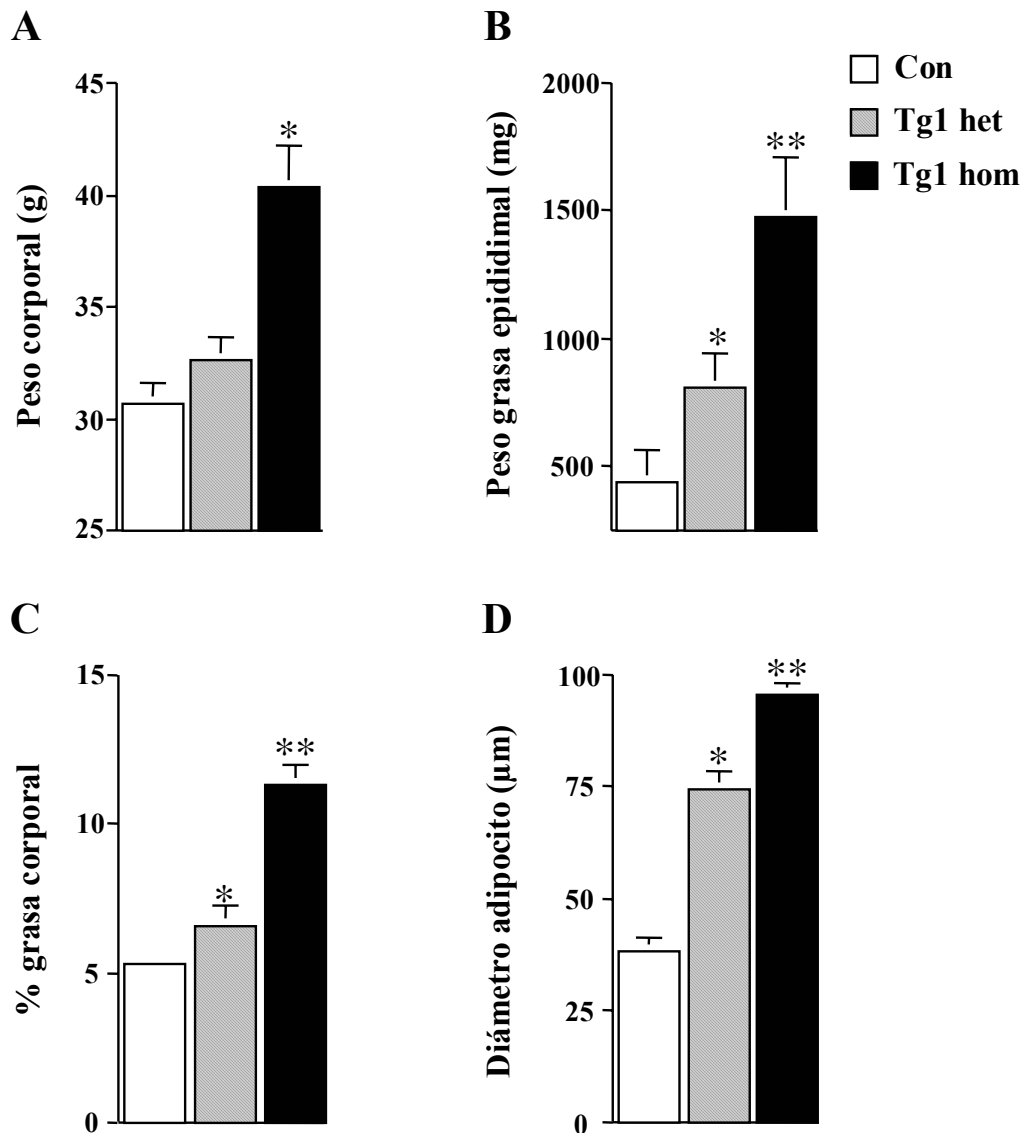


Figura 6. Peso corporal, peso del tejido adiposo blanco epididimal (WAT), porcentaje de grasa corporal y diámetro de los adipocitos. (A) Peso corporal de machos de seis meses de edad. **(B)** Peso del tejido adiposo blanco epididimal (WAT). **(C)** Porcentaje de grasa corporal de machos de seis meses de edad. **(D)** Diámetro de los adipocitos del WAT epididimal. Los resultados se expresan como media \pm SE de ocho animales por grupo. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Controles (Con), transgénicos heterocigotos (Tg1 Het) y transgénicos homocigotos (Tg1 Hom).

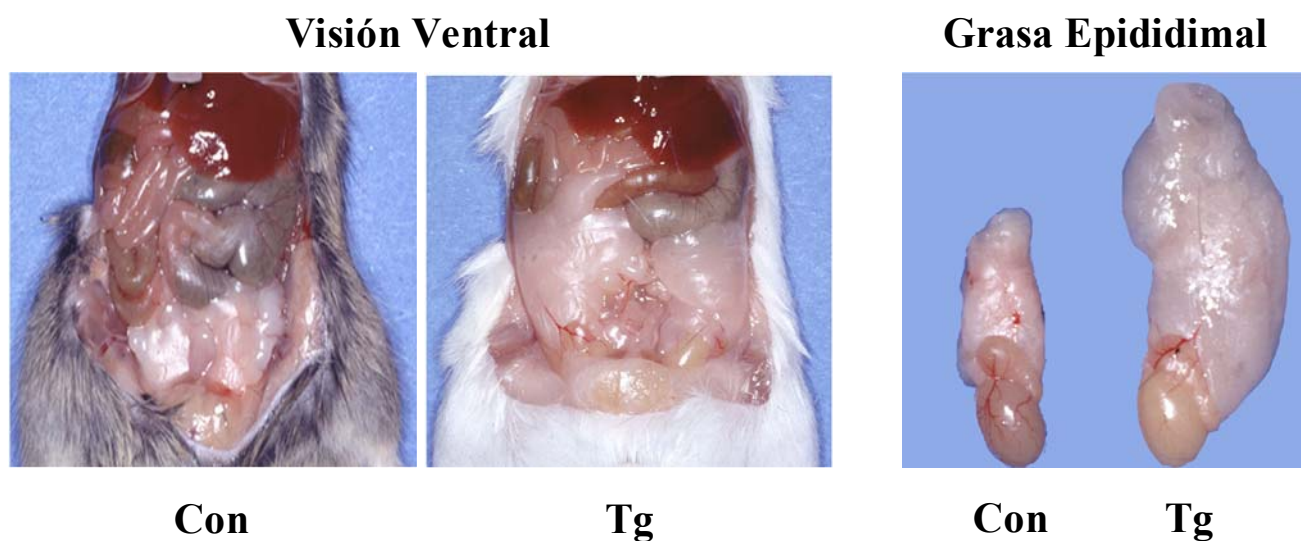


Figura 7. Imágenes representativas de un ratón control y uno transgénico homocigoto. Se muestra una visión ventral de la cavidad abdominal abierta de un animal control y uno transgénico para mostrar la grasa visceral y epididimal. También se muestra el depósito de grasa epididimal unilateral junto con el epidídimo y el testículo.

1.2.2. Estudio histológico del tejido adiposo.

Los análisis histológicos del tejido adiposo de ratones de seis meses de edad, tanto controles como transgénicos, mostraban los adipocitos del tejido adiposo blanco (WAT) con la típica gran vacuola lipídica unilocular. Mientras, los adipocitos del tejido adiposo marrón interescapular (BAT) de ambos animales presentaban multitud de pequeñas vacuolas lipídicas multiloculares (Figura 8). No obstante, en los animales Tg1 heterocigotos y homocigotos, los adipocitos del tejido adiposo blanco eran más grandes que los de un animal control, y el depósito de lípidos también era mayor en los adipocitos del BAT (Figura 8). La hipertrofia del WAT se cuantificó midiendo el diámetro de los adipocitos. Los adipocitos del WAT de los animales Tg1 heterocigotos presentaban un mayor diámetro medio (aprox. de 2 veces) respecto el diámetro medio de los adipocitos blancos de un animal control (Figura 6D).

Este incremento era todavía mayor (unas 3 veces) en los adipocitos del WAT de animales Tg1 homocigotos y paralelo al incremento del peso del tejido adiposo (Figura 8), indicando que la obesidad de estos animales transgénicos era probablemente debida a la hipertrofia del tejido adiposo.

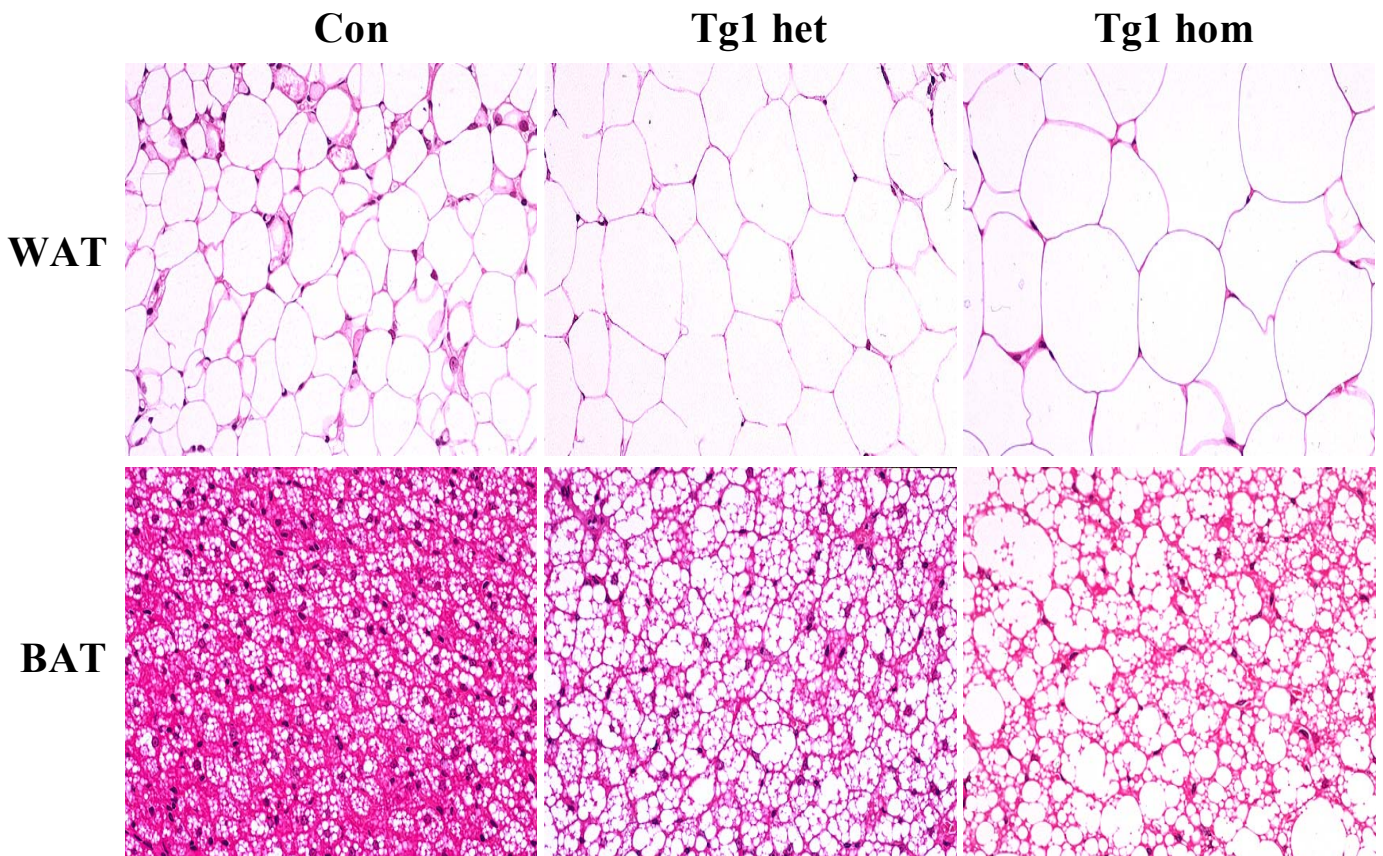


Figura 8. Análisis histológico del tejido adiposo blanco epididimal (WAT) y del tejido adiposo marrón interescapular (BAT). Se representan secciones representativas del WAT (panel superior) y BAT (panel inferior) de animales controles y animales transgénicos (heterocigotos y homocigotos) teñidas con hematoxilina y eosina (x400).

1.2.3. Determinación de la gliceroneogénesis y reesterificación de ácidos grasos libres.

Tanto la gliceroneogénesis como la reesterificación de los ácidos grasos libres se estudiaron en el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos aP2-PEPCK. La conversión de ^{14}C -piruvato a glicerol estaba incrementada (unas 2 a 2.5 veces) en el WAT de los animales transgénicos respecto a los controles (Figura 9A). Esto indicaba que se había producido un incremento en la gliceroneogénesis en el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos aP2-PEPCK. Por el contrario, la síntesis *de novo* de ácidos grasos no estaba significativamente alterada en los animales transgénicos (control 32.4 ± 10 cpm/mg proteína *vs.* Tg1 het 25 ± 3.5 cpm/mg proteína). Además, la tasa de reesterificación de ácidos grasos libres también fue mayor (2 veces) en el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos respecto los controles (Figura 9B). Estos resultados nos indicaban que en los ratones transgénicos aP2-PEPCK, una mayor actividad enzimática de PEPCK en el tejido adiposo llevaba a un incremento en la gliceroneogénesis y en la reesterificación de los ácidos grasos libres.

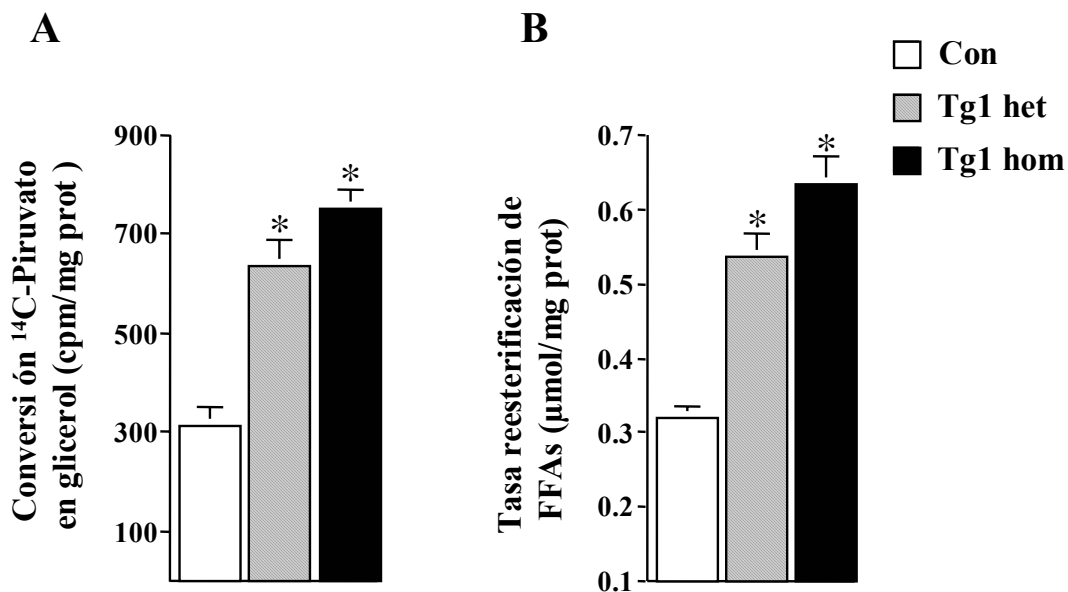


Figura 9. Gliceroneogénesis y reesterificación de ácidos grasos libres (FFAs) en WAT de animales controles y transgénicos ayunados. La gliceroneogénesis (A) y la tasa de reesterificación de FFAs (B) se determinó en fragmentos del WAT epididimal *in vitro* de ratones controles y transgénicos, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm SE de al menos seis animales por grupo. * $P < 0.05$.

1.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS SISTÉMICOS PROVOCADOS POR LA SOBREENPRESIÓN DE PEPCK EN TEJIDO ADIPOSO.

1.3.1. Análisis de la glucemia e insulinemia.

La obesidad suele estar frecuentemente asociada a la diabetes tipo 2, un desorden metabólico caracterizado por una resistencia a la insulina. Como ya se ha descrito anteriormente los animales transgénicos homocigotos aP2-PEPCK eran obesos, por lo que realizamos a continuación estudios sobre las implicaciones del incremento en la masa grasa a nivel sistémico. A partir de animales de cuatro a seis meses de edad, se determinó la concentración de glucosa y de insulina sanguíneas, tanto en animales Tg1 heterocigotos y homocigotos como en animales controles, en estado de alimentación y de ayunas (Tabla 1).

En ninguna de las condiciones estudiadas se observaron diferencias en la glucemia entre los animales transgénicos (heterocigotos y homocigotos) y los animales controles. De igual forma, tampoco se encontraron diferencias en los niveles de insulina circulante, tanto en alimentación como en ayunas.

		Glucosa (mg/dl)	Insulina (ng/ml)
Alimentados	Con	141 ± 6	1.10 ± 0.16
	Tg1 Het	157 ± 10	1.09 ± 0.08
	Tg1 Hom	139 ± 6	1.04 ± 0.20
Ayunados	Con	87 ± 4	0.58 ± 0.08
	Tg1 Het	84 ± 5	0.50 ± 0.08
	Tg1 Hom	90 ± 11	0.57 ± 0.04

Tabla 1. Niveles de glucosa e insulina circulantes. Las glucemias e insulinemias de animales de cuatro a seis meses de edad, ayunados y alimentados, se determinaron según se indica en los Materiales y Métodos. Los datos representan la media ±SE de ocho animales por grupo. Controles (Con), transgénicos heterocigotos (Tg1 Het) y homocigotos (Tg1 Hom).

1.3.2. Test de tolerancia a la glucosa.

Se realizó un test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa a animales de cuatro meses de edad ayunados durante una noche. Los ratones Tg1 heterocigotos y homocigotos presentaban glucemias similares a los animales controles, a los 30 minutos tras la inyección intraperitoneal de 1 g glucosa/kg de peso corporal (Figura 10A). Transcurridos 180 minutos, las glucemias regresaban a los niveles basales iniciales de forma similar en todos los grupos de animales (Figura 10A). Esto nos indicaba que los animales obesos transgénicos aP2-PEPCK mostraban una respuesta a la inyección intraperitoneal de glucosa similar a la de un animal control, es decir, presentaban una tolerancia a la glucosa normal.

1.3.3. Test de tolerancia a la insulina.

Debido a la obesidad que presentaban los animales transgénicos aP2-PEPCK, se determinó también la sensibilidad corporal a la insulina. Para ello, se realizó un test intraperitoneal de tolerancia a la insulina a animales alimentados de cuatro meses de edad. La glucemia inicial en alimentación de los animales controles y transgénicos (heterocigotos y homocigotos) era similar y disminuyeron de forma pareja, a los 30 minutos tras la inyección intraperitoneal de insulina (Figura 10B). Es más, los animales transgénicos aP2-PEPCK homocigotos mostraban una tendencia a presentar niveles de glucosa circulantes inferiores a los de un animal control, a los 45 y 60 minutos tras la inyección (Figura 10B). Este resultado nos indicaba que no sólo los animales obesos transgénicos aP2-PEPCK no desarrollaban una resistencia a la insulina, sino que la respuesta hipoglucemiante a la inyección de la hormona incluso tendía a ser mayor.

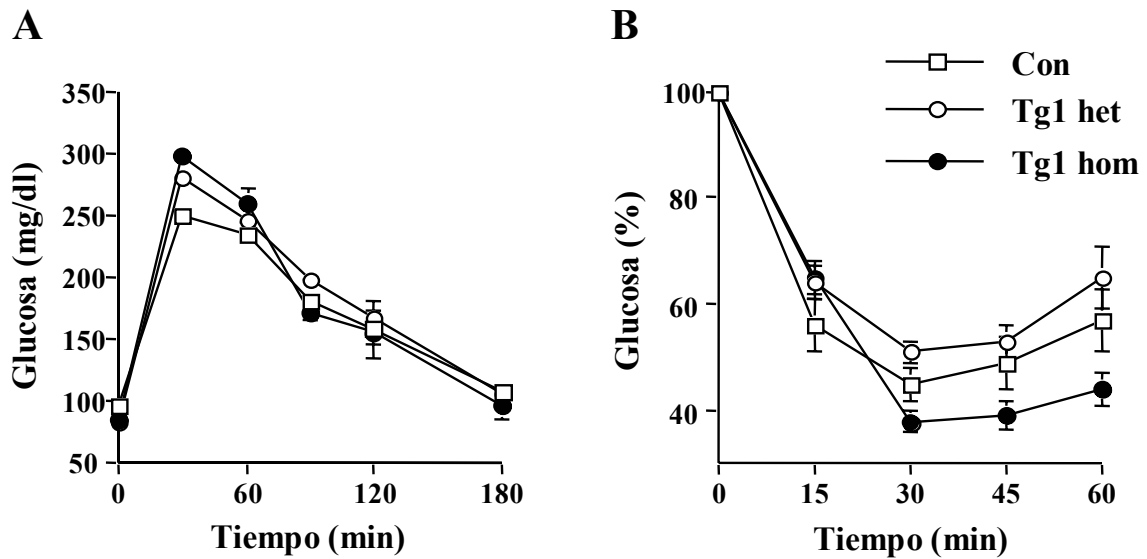


Figura 10. Test intraperitoneal de tolerancia a glucosa y a la insulina. (A) Test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa. A animales controles (Con), Tg1 heterocigotos (Tg1 het) y homocigotos (Tg1 hom) de cuatro meses de edad, ayunados durante una noche, se les inyectó intraperitonealmente glucosa (1g/kg de peso). Las muestras de sangre fueron tomadas de la cola de los mismos animales a los tiempos indicados y se determinó la concentración de glucosa. Los resultados se presentan como medias \pm SE de al menos seis animales por grupo. **(B)** Test intraperitoneal de tolerancia a la insulina. Se inyectó intraperitonealmente insulina (0.75 U/kg peso) (Humulina Regular, Eli Lilly, Indianapolis, IN) a animales controles y transgénicos alimentados despiertos. Las muestras de sangre fueron tomadas de la cola de los mismos animales a los tiempos indicados y se determinó la glucosa sanguínea. Los resultados fueron calculados como porcentaje de la glucemia inicial a tiempo 0 para cada animal y expresados como media \pm SE de al menos seis animales por grupo.

1.3.4. Utilización de glucosa *in vivo* por el músculo esquelético.

A fin de corroborar que los ratones transgénicos obesos no habían desarrollado resistencia a la insulina, también se determinó la captación y utilización de la glucosa estimulada por la hormona por el músculo esquelético *in vivo*. La captación basal de [2-³H]-deoxiglucosa fue similar en los animales Tg1 homocigotos y los animales controles (Figura 11). Cuando se inyectó insulina, la captación de [2-³H]-deoxiglucosa por el músculo esquelético incrementó unas 2.5 veces tanto en los animales controles como en los transgénicos homocigotos (Figura 11). Estos resultados nos sugerían que la sobreexpresión de PEPCK no alteraba el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético. Además nos

indicaban que, a pesar de que los animales transgénicos homocigotos eran obesos, éstos no desarrollaban resistencia a la insulina.

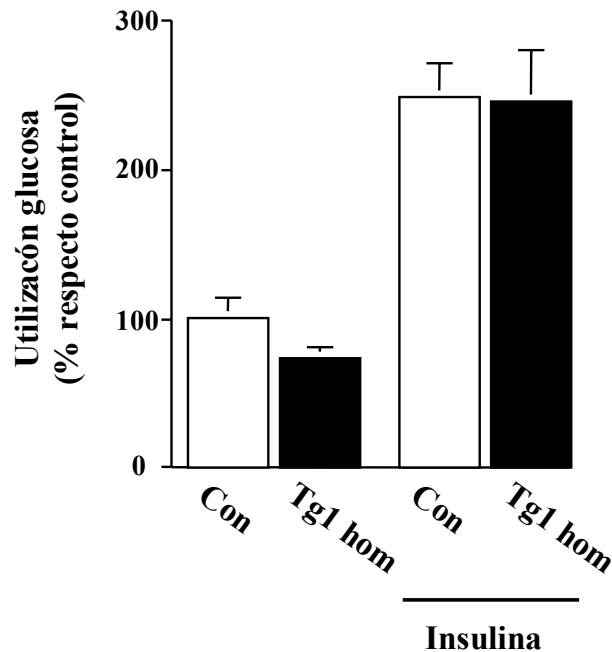


Figura 11. Índice de la utilización de la glucosa por el músculo esquelético. La captación de glucosa se determinó en el músculo esquelético (gastrocnemio y cuádriceps) de animales controles y Tg1 homocigotos alimentados, tratados y no tratados (basal) con insulina inyectada intraperitonealmente, tal y como se indica en los Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje de la utilización basal de glucosa por el músculo de animales controles ($20 \text{ pmol} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Los resultados representan la media \pm SE de cuatro animales por grupo.

1.3.5. Determinación de otros metabolitos sanguíneos y hormonas circulantes.

También se estudiaron otros parámetros sanguíneos que pudieran alterarse por la sobreexpresión de PEPCK a nivel del tejido adiposo, especialmente aquellos que pudieran resultar del incremento en la masa adiposa que presentaban los animales transgénicos aP2-PEPCK.

1.3.5.1. Triglicéridos y lactato séricos.

En primer lugar, se determinaron los niveles de triglicéridos y lactato sanguíneos en alimentación y en ayunas (Tabla 2). Como se puede observar, no existían diferencias entre los animales controles y transgénicos en la concentración sérica de triglicéridos. Aunque el lactato es otro de los substratos de la gliceroneogénesis, los niveles circulantes de lactato eran similares en los animales controles y en los transgénicos.

		Triglicéridos (mg/dl)	Lactato (mM)
Alimentados	Con	137 ± 24	5.29 ± 0.19
	Tg1 Het	138 ± 23	n.d.
	Tg1 Hom	140 ± 18	5.33 ± 0.17
Ayunados	Con	99 ± 14	n.d.
	Tg1 Het	103 ± 12	n.d.
	Tg1 Hom	116 ± 6	n.d.

Tabla 2. Niveles circulantes de triglicéridos y lactato. Los triglicéridos y lactato séricos de animales de cuatro a seis meses de edad ayunados y alimentados se determinaron según se indica en Materiales y Métodos. Los datos representan la media ±SE de ocho animales por grupo. Controles (Con), transgénicos heterocigotos (Tg1 Het) y homocigotos (Tg1 Hom). n.d.: no determinado.

1.3.5.2. Ácidos grasos libres y glicerol séricos.

En animales alimentados, la mayor parte de los FFAs circulantes proceden de la comida ingerida, ya que la lipólisis de los triglicéridos en el tejido adiposo está inhibida por la insulina. Así, en condiciones de alimentación, se observó que las concentraciones de FFAs eran similares en los animales controles y transgénicos (Figura 12A). En cambio, en los animales controles ayunados, debido al incremento de la lipólisis en tejido adiposo, los niveles séricos de FFAs incrementaban unas 4 veces en relación a los controles alimentados (Figura 12A). Esto contrastaba con los animales transgénicos ayunados, tanto heterocigotos como

homocigotos, ya que sólo se observaba un incremento de dos veces respecto a los transgénicos alimentados (Figura 12A). Este resultado nos indicaba que la liberación de FFAs por el tejido adiposo estaba marcadamente disminuida en los animales transgénicos aP2-PEPCK. Sin embargo, tanto en condiciones de alimentación como en ayunas, se observaron niveles séricos de glicerol similares en los tres grupos de animales estudiados (Figura 12B). Ello indicaba que la lipólisis era la misma en los animales controles y transgénicos.

La liberación de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo está generalmente incrementada en la obesidad. No obstante, nuestros resultados indicaban que los niveles circulantes de FFAs estaban incluso más bajos en los ratones obesos transgénicos que en los animales controles no obesos. Ello probablemente era el resultado de un incremento en la velocidad de reesterificación de FFAs por el tejido adiposo.

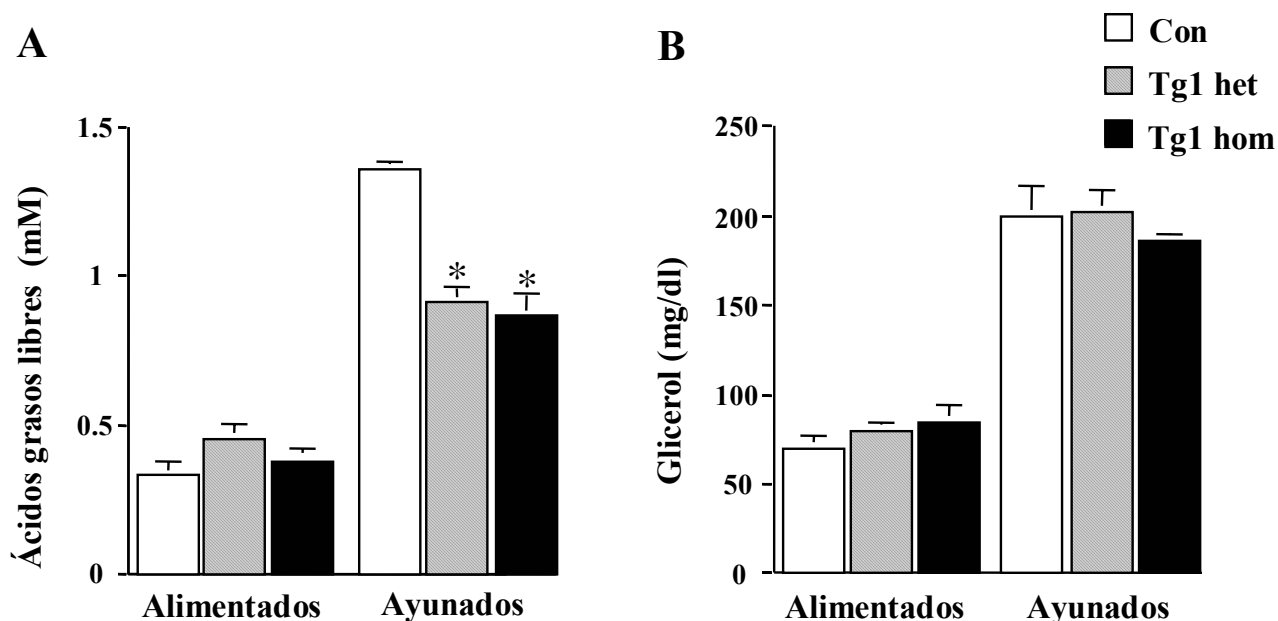


Figura 12. Niveles séricos de ácidos grasos libres y glicerol en animales transgénicos aP2-PEPCK. Los ácidos grasos libres (A) y el glicerol (B) se determinaron en el suero de animales alimentados o ayunados de seis meses de edad, tal y como se indica en los Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm SE de al menos ocho animales por grupo. * $P < 0.05$. Controles (Con), Tg1 heterocigotos (Tg1 Het) y homocigotos (Tg1 Hom).

1.3.5.3. Determinación de leptina y de TNF- α .

La producción de leptina y TNF- α por parte del tejido adiposo están incrementadas durante la obesidad y pueden afectar a la homeostasis de la glucosa. Dado que los animales transgénicos eran obesos, se determinó los niveles de leptina circulante y la expresión del mRNA de TNF- α en el tejido adiposo. Así, se observó que en el tejido adiposo blanco de los animales obesos transgénicos, los niveles de expresión de TNF- α eran similares a los de un animal control (resultados no mostrados). Asimismo, en animales alimentados de 6 meses de edad, no se encontraron alterados los niveles circulantes de leptina (control, 5.4 ± 0.4 ; Tg1 heterocigotos, 5.4 ± 0.6 y Tg1 homocigotos 5.4 ± 0.4 ng/mL, n=8). Estos resultados sugerían que el incremento en la masa de tejido adiposo en ausencia de un incremento en los niveles circulantes de FFAs no alteraba los niveles circulantes de leptina ni la expresión de TNF- α .

Por tanto, nuestros resultados indicaban que un aumento de la actividad PEPCCK en tejido adiposo llevaba a un incremento en la gliceroneogénesis, resultando un aumento de la reesterificación de FFAs y del depósito de grasa en este tejido. Además, aunque los animales transgénicos aP2-PEPCCK eran obesos no mostraban resistencia a la insulina, probablemente debido a la ausencia de un incremento en los niveles séricos de FFAs (Figura 26).

1.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN LÍPIDOS EN LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS α P2-PEPCK.

Con el fin de estudiar si un incremento en la reesterificación de ácidos grasos era capaz de contrarrestar el incremento en los niveles séricos de FFAs y la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en lípidos (HFD), estos animales transgénicos homocigotos se alimentaron este tipo de dieta durante seis semanas.

1.4.1. Efecto de la dieta alta en lípidos sobre el peso corporal.

Animales machos de tres meses de edad, controles y transgénicos homocigotos, se alimentaron con una dieta alta en lípidos durante seis semanas. Durante este periodo, los ratones controles alimentados con una dieta estándar apenas modificaban su peso corporal. Sin embargo, los animales transgénicos homocigotos en dieta estándar incrementaban su peso aproximadamente un 10% respecto al peso al inicio del experimento (Figura 13A). En cambio, mientras que los ratones controles alimentados con una dieta HFD incrementaban aproximadamente un 20% su peso corporal inicial, los transgénicos ganaban un 40% (Figura 13A). Además, este mayor incremento en la ganancia de peso en los ratones transgénicos no era debido a una mayor ingesta de alimento, ya que no se observaron diferencias en la cantidad de alimento ingerido entre los controles y los transgénicos en dieta HFD (Figura 13B). De hecho, un resultado similar se había observado en animales alimentados con una dieta estándar.

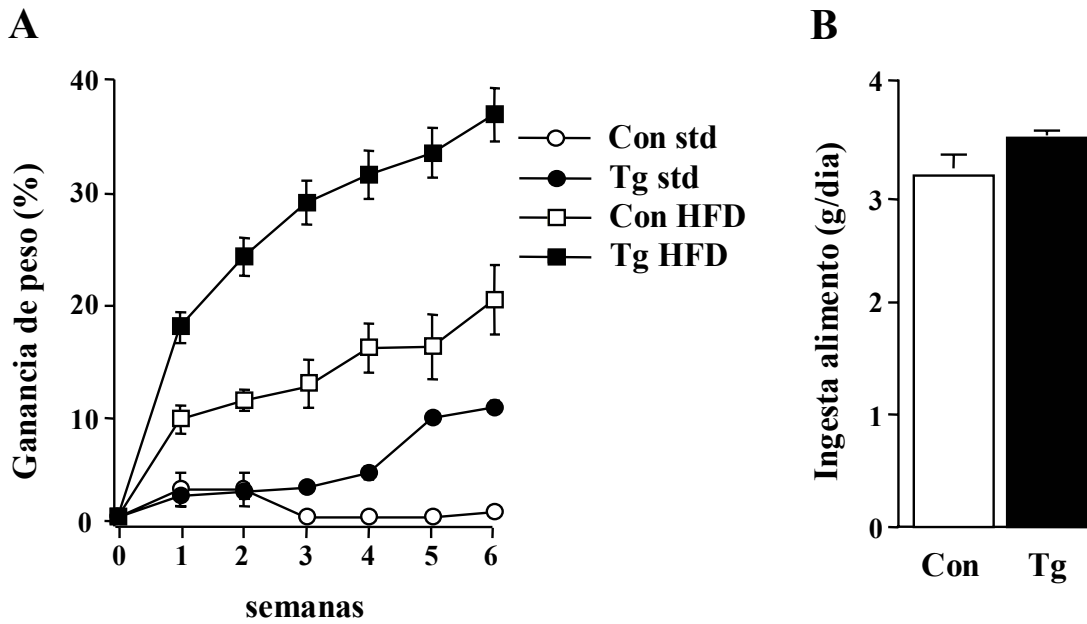


Figura 13. Evolución del peso corporal de animales machos de tres meses de edad durante las seis semanas del estudio. (A) Tanto animales controles (Con) como transgénicos homocigotos (Tg) fueron alimentados con una dieta estándar (std) o una dieta alta en lípidos (HFD) durante seis semanas. A partir del peso inicial de cada animal, se determinó la ganancia de peso corporal a lo largo de las seis semanas. Los resultados se expresan como porcentaje de ganancia de peso. Los datos se representan como las medias \pm SE de al menos doce animales por grupo. **(B)** Ingesta de alimento en los ratones controles y transgénicos homocigotos sometidos a una dieta alta en lípidos. Los resultados se expresan como la ingesta diaria de alimento por animal (g de alimento/día/animal). Los datos se representan como las medias \pm SE de al menos diez animales por grupo.

1.4.2. Efecto del consumo de la dieta HFD en el tejido adiposo blanco.

A continuación se determinó el peso del tejido adiposo blanco epididimal (WAT) y la expresión de la PEPCCK en el WAT. También, se realizaron estudios histológicos del WAT a fin de determinar si el incremento de peso corporal era el resultado de un aumento en la masa grasa como consecuencia de la sobreexpresión de PEPCCK.

1.4.2.1. Análisis del peso del tejido adiposo blanco epididimal y expresión de PEPCK tras la dieta HFD.

Como se ha descrito previamente, los animales transgénicos en dieta estándar mostraban un incremento en el peso del WAT (Figura 14A, tiempo 0). Tras seis semanas en dieta alta en lípidos, los animales controles mostraban un incremento en el peso del WAT de un 300% respecto a los controles en dieta estándar (Figura 14A). Tras ese mismo periodo de tiempo, los ratones transgénicos presentaban un incremento en el peso del WAT de un 600% respecto a los controles en dieta estándar. En cambio, aunque los animales transgénicos mostraban un incremento en el peso del WAT respecto a los transgénicos en dieta estándar (alrededor del 40%), este incremento era mucho menor que en el caso de los animales controles (Figura 14A). A pesar de ello, el peso del WAT de los transgénicos en dieta alta en lípidos continuaba siendo significativamente superior al de los controles en dicha dieta (Figura 14A). Por tanto, los animales transgénicos desarrollaban una obesidad severa tras las seis semanas en dieta alta en lípidos, y este incremento en la cantidad de grasa acumulada probablemente era la causa de la mayor ganancia de peso observada.

Además, se determinó la expresión de la PEPCK en el WAT tras la dieta alta en lípidos. Los ratones transgénicos aP2-PEPCK en dieta estándar mostraban un incremento de seis veces en la expresión del mRNA de la PEPCK en el WAT respecto a los controles (Figura 14B). Tras la dieta, se observó un incremento similar en los niveles de PEPCK en los transgénicos respecto a los controles (Figura 14B). Finalmente, se determinó los niveles de la proteína PEPCK en el tejido adiposo blanco de los animales controles y transgénicos alimentados, tras la dieta (Figura 14C). Mientras que no se detectó la presencia de la proteína PEPCK en los ratones controles alimentados, los animales transgénicos continuaban expresándola tras la dieta HFD. Estos resultados indicaban que la sobreexpresión de PEPCK en tejido adiposo no era alterada por la dieta alta en lípidos.

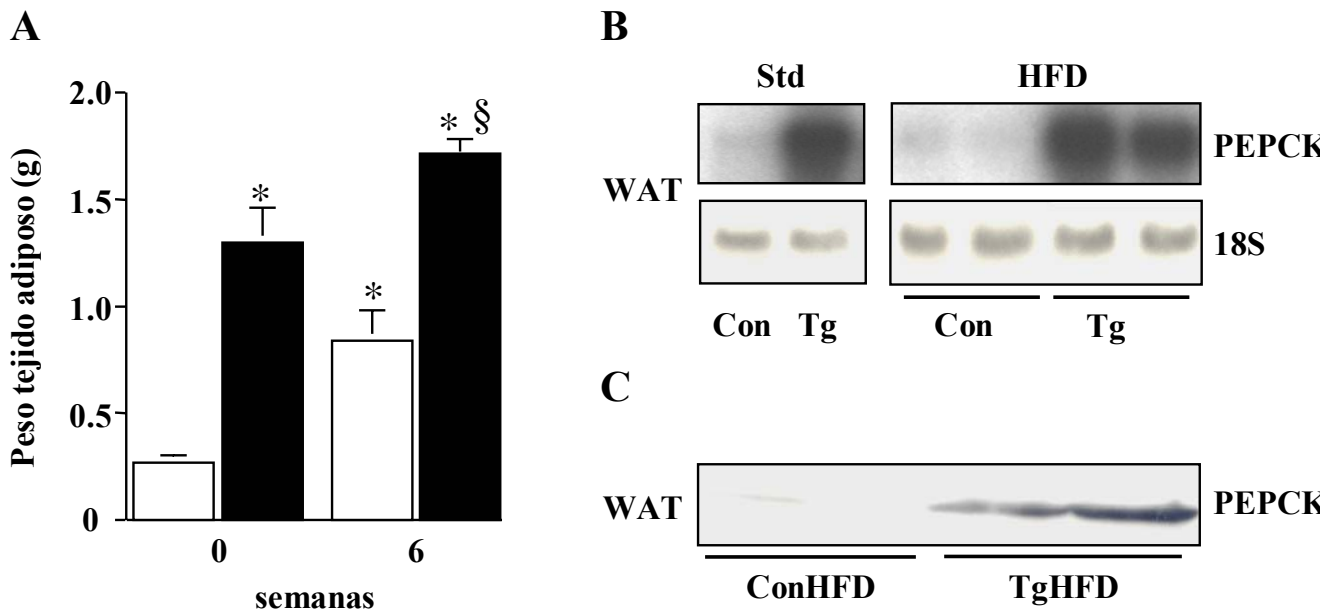


Figura 14. Estudio del tejido adiposo blanco epididimal de animales alimentados con una dieta alta en lípidos. (A) Peso del WAT de animales controles (columna blanca) y transgénicos (columna negra) antes (semana 0) y después de las seis semanas de dieta HFD (semana 6). A partir de estos animales, se determinaron tanto los niveles de expresión **(B)** como los niveles de la proteína PEPCK en el tejido adiposo blanco **(C)**, tal y como se describe en los Materiales y Métodos. El Northern blot del tejido adiposo blanco epididimal se hibridó tanto con una sonda específica para la PEPCK como para el mRNA del 18S. Los datos se representan como las medias \pm SE de al menos diez animales por grupo. * $P \leq 0.01$ vs controles en dieta estándar, § $P \leq 0.01$ vs controles en dieta alta en lípidos.

1.4.2.2. Análisis histológico del tejido adiposo blanco epididimal tras una dieta alta en lípidos.

A continuación se realizaron cortes histológicos del WAT epididimal, tanto en animales controles como en transgénicos homocigotos, sometidos a dieta estándar o a dieta alta en lípidos. Tal y como ya se ha descrito previamente, los adipocitos blancos de los animales transgénicos en dieta estándar mostraban un incremento del tamaño respecto a los de los controles (Figura 15). Tras la dieta alta en lípidos, los adipocitos blancos de ambos grupos incrementaban de tamaño, especialmente en los animales transgénicos donde se podían observar adipocitos con un gran acúmulo de triglicéridos (Figura 15). Estos resultados

sugerían que un incremento en la gliceroneogénesis y en la reesterificación de ácidos grasos desencadenaba una obesidad severa en los animales transgénicos.

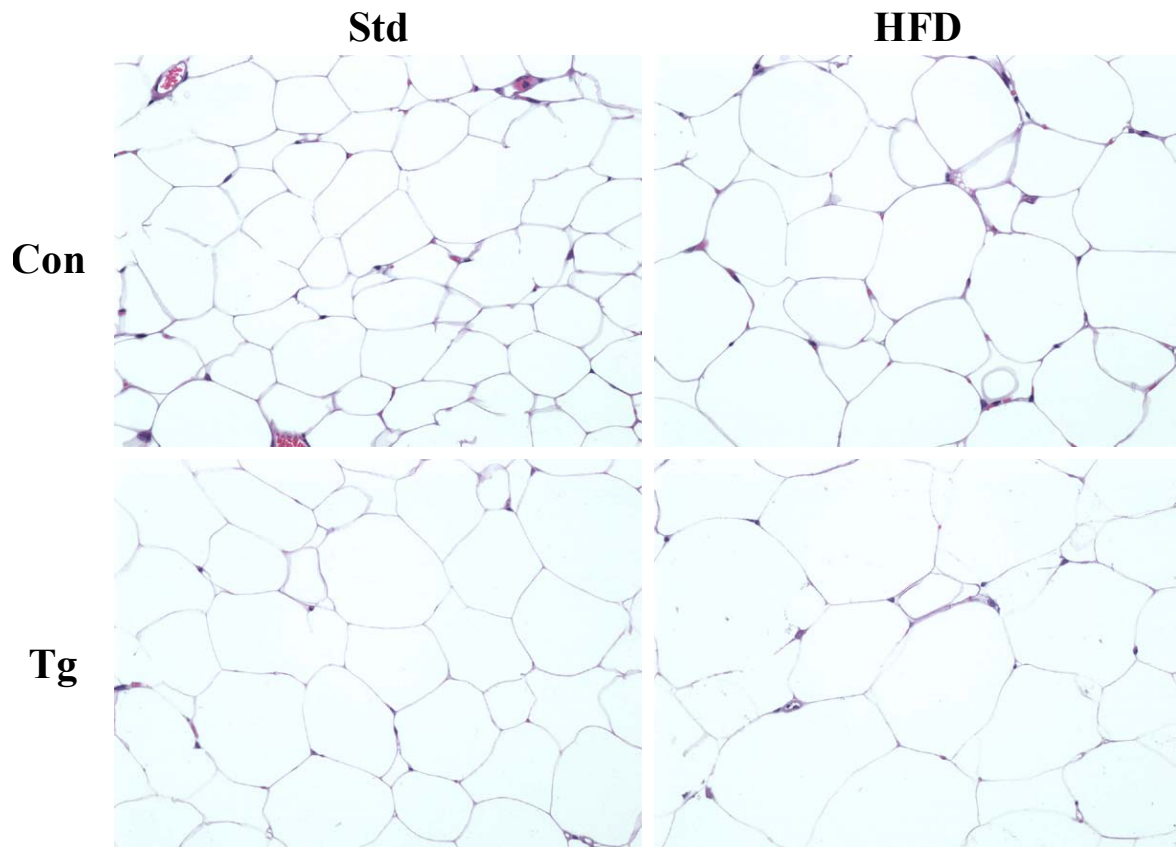


Figura 15. Cortes histológicos representativos del tejido adiposo blanco epididimal. Se muestran secciones del WAT de animales machos controles (Con) y transgénicos homocigotos (Tg) de 3 meses de edad, en dieta estándar (Std) y tras 6 semanas en dieta alta en lípidos (HFD). Los cortes histológicos han sido teñidos con hematoxilina y eosina (x400).

1.4.3. Estudio de los efectos sistémicos de la dieta alta en lípidos en los animales aP2-PEPCK.

1.4.3.1. Determinación de la glucemia e insulinemia.

Al inicio del experimento, los animales transgénicos y controles presentaban glucemias similares, tanto en alimentación como en ayunas (Figura 16A, semana 0). Sin embargo, se observó un incremento significativo en la glucemia de ambos grupos seis semanas después, tanto en alimentación como en ayunas. La hiperglucemia debida al efecto de la dieta era mayor cuando los controles y transgénicos se ayunaban (Figura 16B). No obstante, no se observaron diferencias en los niveles circulantes de glucosa entre controles y transgénicos en ninguna de las dos condiciones (Figura 16A-16B).

En cuanto a la insulinemia en alimentación, no existían diferencias en los niveles circulantes de la hormona entre los animales controles y transgénicos en dieta estándar (Figura 16C). A pesar de la corta exposición a la dieta diabetogénica, los ratones controles alimentados ya mostraban un ligero, pero significativo, incremento (de 1.5 veces) en su insulinemia. En cambio, los transgénicos en dieta HFD presentaban un incremento mucho mayor que los controles (aproximadamente 14 veces) (Figura 16C). Estos resultados sugerían que los ratones transgénicos eran mucho más sensibles al efecto diabetogénico de la dieta alta en lípidos, ya que desarrollaban una gran hiperinsulinemia. Además, ello sugería que los animales transgénicos en dieta HFD eran más resistentes a la insulina que los controles, ya que necesitaban una secreción mayor de la hormona para mantener unos niveles similares de glucosa circulante.

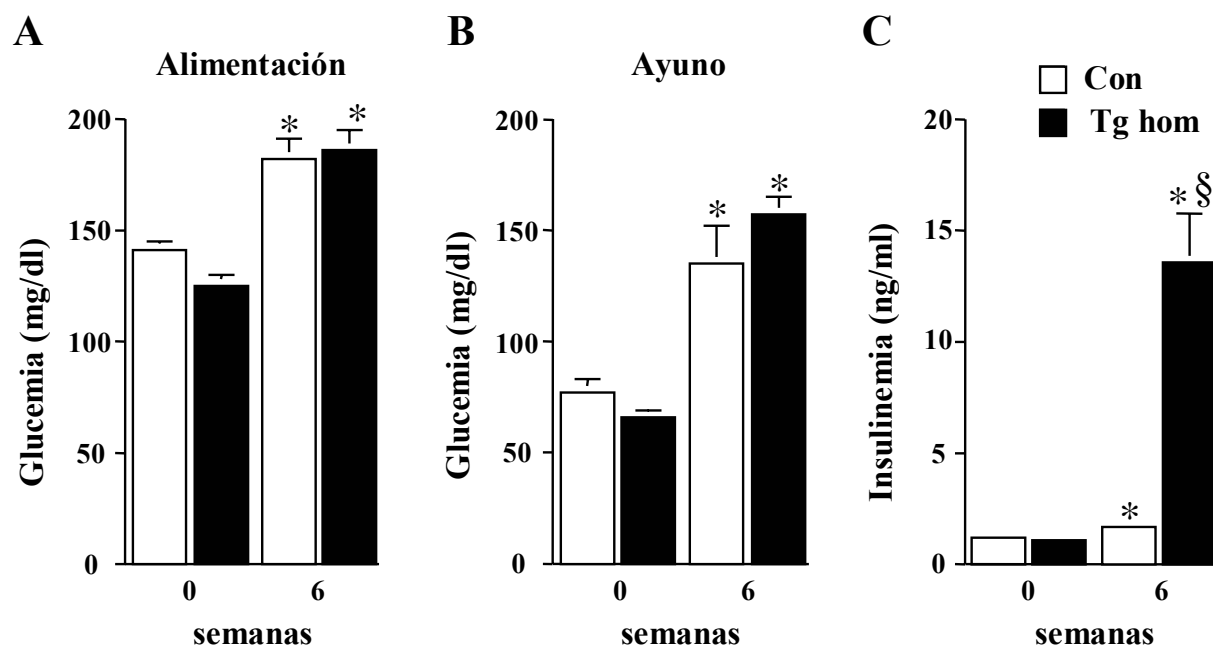


Figura 16. Glucemias e insulinemias de animales controles y transgénicos, antes y después de la dieta. Glucemias en ratones machos controles y transgénicos alimentados (A) y ayunados durante 15 horas (B). (C) Niveles circulantes de insulina en animales alimentados, antes y tras seis semanas de dieta alta en lípidos. Todos los datos se representan como las medias \pm SE de doce animales por grupo. * $P \leq 0.01$ vs controles en dieta estándar, § $P \leq 0.01$ vs controles en dieta alta en lípidos.

1.4.3.2. Test intraperitoneal de tolerancia a la insulina.

A continuación se realizó un test de tolerancia a la insulina para confirmar si los animales transgénicos habían desarrollado resistencia a la hormona. Tras la inyección intraperitoneal de la insulina exógena, los controles en dieta estándar reducían su glucemia inicial aproximadamente en un 60%. En cambio, los controles en dieta rica en lípidos la reducían en un 50% y a lo largo del test mantenían niveles séricos de glucosa por encima de los controles en dieta estándar (Figura 17A). Por contra, los animales transgénicos en dieta alta en lípidos tan sólo reducían un 30% su glucemia inicial y recuperaban los niveles de glucosa circulante iniciales más rápido que el resto de grupos de animales (Figura 17A). Por tanto, aunque seis semanas en dieta alta en lípidos era suficiente para inducir una ligera resistencia a la insulina en los ratones controles, abolía la respuesta hipoglucemiante de la hormona exógena en los animales transgénicos.

1.4.3.3. Test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa.

También se realizó un test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa tras un ayuno nocturno a animales controles en dieta estándar y ratones controles y transgénicos en dieta alta en lípidos. Tras el periodo en dieta, los animales transgénicos presentaban glucemias superiores a los controles y eran incapaces de recuperar los valores basales de glucosa a los 150 minutos después de la inyección intraperitoneal de glucosa (Figura 17B). Por el contrario, los ratones controles en dieta alta en lípidos presentaban una respuesta similar a los controles en dieta estándar (Figura 17B). Estos resultados indicaban que los ratones transgénicos no sólo eran más resistentes a la insulina que los controles, sino que también habían desarrollado una mayor intolerancia a la glucosa. En cambio, los animales controles en dieta alta en lípidos, aunque eran ligeramente resistentes a la insulina, aún presentaban una tolerancia a la glucosa similar a la de los controles en dieta estándar.

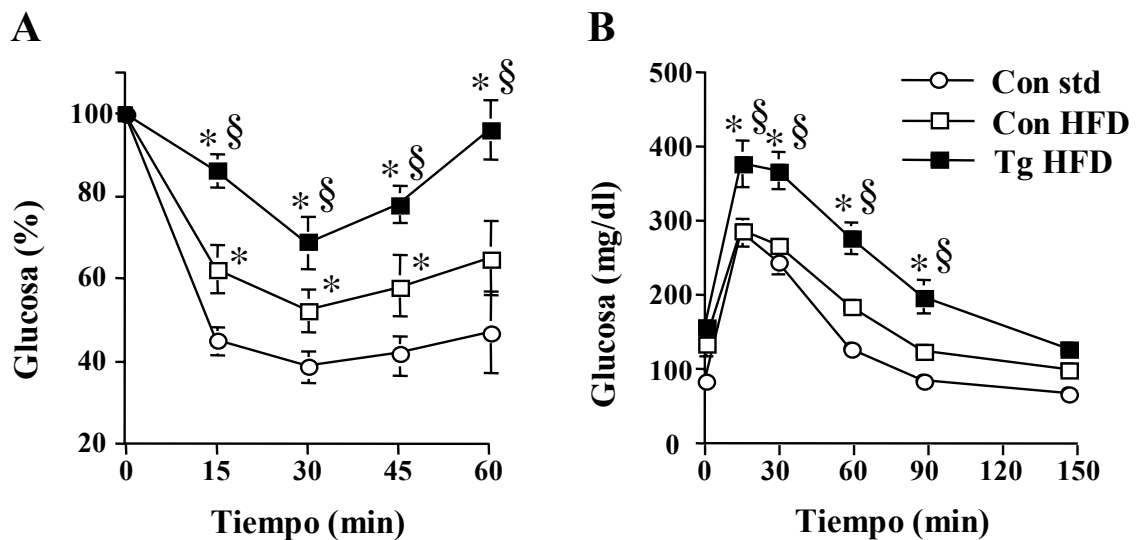


Figura 17. Test intraperitoneal de tolerancia a la insulina y a la glucosa en animales controles y transgénicos tras seis semanas en dieta alta en lípidos. (A) Test intraperitoneal de tolerancia a la insulina. A animales despiertos se les inyectó intraperitonealmente insulina (0.75 U/kg peso). Los resultados se calcularon como porcentaje de la glucemia inicial a tiempo 0 para cada animal. (B) Test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa. Se inyectó intraperitonealmente glucosa (1g/kg de peso) a animales despiertos, tras ser ayunados una noche. Las muestras de sangre fueron tomadas de la cola de los mismos animales a los tiempos indicados y se determinó la concentración de glucosa. Los resultados se expresan como la media \pm SE de al menos seis animales por grupo. Animales controles en dieta estándar (Con std), animales controles y transgénicos en dieta alta en lípidos (Con HFD y Tg HFD, respectivamente). * $P < 0.01$ vs controles en dieta estándar, § $P < 0.01$ vs controles en dieta alta en lípidos.

1.4.3.4. Determinación de los niveles circulantes de triglicéridos y ácidos grasos libres.

Los animales transgénicos en dieta alta en lípidos mostraban una obesidad severa, acompañada de una gran resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Dado que, asociado a la obesidad también se suele encontrar un incremento en los niveles circulantes de triglicéridos y FFAs, se determinaron los niveles séricos de ambos en animales controles y transgénicos sometidos a la dieta HFD. Tal y como ya se ha descrito anteriormente, los animales transgénicos en dieta estándar, a pesar de ser obesos, mostraban niveles circulantes de triglicéridos similares a los de un animal control (Figura 18). Sin embargo, tras la dieta alta en lípidos, los ratones transgénicos presentaban hipertrigliceridemia, mientras que los controles mostraban unos niveles circulantes de triglicéridos similares a los de un control en dieta estándar (Figura 18).

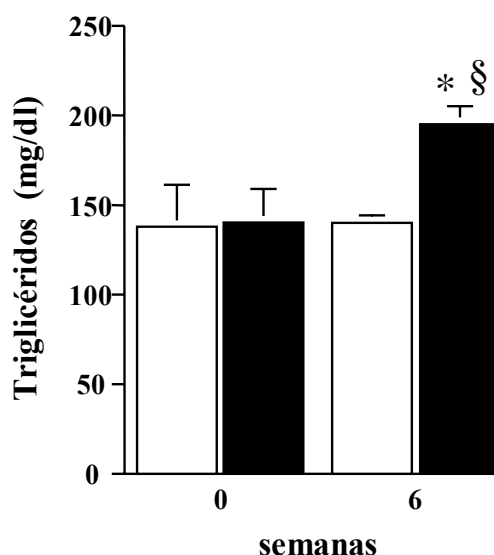


Figura 18. Niveles circulantes de triglicéridos en animales alimentados, antes y tras la dieta alta en lípidos. Los resultados son expresados como las medias \pm SE de al menos seis animales por grupo. Los controles se representan en la columna blanca mientras que los transgénicos en la columna negra. * $P \leq 0.01$ vs controles en dieta estándar, § $P \leq 0.01$ vs controles en dieta alta en lípidos.

También se determinaron los niveles séricos de FFAs en los animales controles y transgénicos en dieta alta en lípidos, tanto en condiciones de alimentación como en ayunas. Los ratones controles y transgénicos alimentados mostraban un incremento similar en los niveles circulantes de FFAs respecto a los animales en dieta estándar (Figura 19). Este incremento en los niveles séricos de FFAs era probablemente debido al efecto de la dieta alta en lípidos y al desarrollo de resistencia a la insulina en el tejido adiposo, lo que llevaría a una mayor lipólisis. Aunque en dieta estándar los animales transgénicos ayunados mostraban unos niveles circulantes de FFAs disminuidos respecto a los controles, no se observaron diferencias entre los controles y transgénicos tras la dieta, tanto en ayunas como en alimentación (Figura 19). A pesar de la obesidad severa que presentaban los animales transgénicos en dieta alta en lípidos, no mostraban un mayor incremento en los niveles circulantes de FFAs respecto a los controles, probablemente debido a la mayor reesterificación en el tejido adiposo. Es más, la ausencia de un mayor incremento en los niveles séricos de FFAs en los transgénicos en dieta HFD respecto a los controles, descartaba a los FFAs como la causa de su mayor grado de resistencia a la insulina observado.

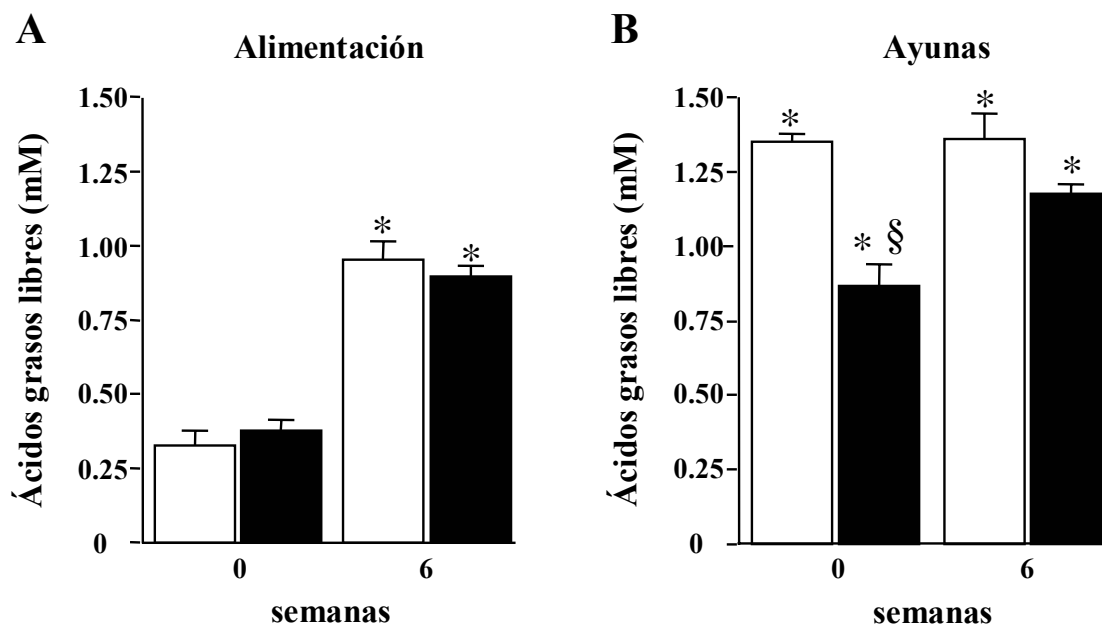


Figura 19. Niveles circulantes de FFAs en animales alimentados y ayunados, antes y después de administrarles una dieta alta en lípidos durante seis semanas. Los resultados son expresados como las medias \pm SE de doce animales por grupo. Los controles se representan en la columna blanca mientras que los transgénicos en la columna negra. * $P \leq 0.01$ vs controles en dieta estándar alimentados, § $P \leq 0.01$ vs controles en dieta estándar ayunados.

1.4.3.5. Determinación de los niveles circulantes de adipocinas.

Dado que los animales transgénicos mostraban una obesidad y resistencia a la insulina severas tras la dieta, se determinaron las concentraciones séricas de interleuquina-6 (IL-6), TNF- α , leptina y adiponectina. Los niveles circulantes de IL-6 y TNF- α eran indetectables, tanto en controles como en transgénicos, antes y después de la dieta (resultados no mostrados). Ello indicaba que la resistencia a la insulina observada en los ratones transgénicos en dieta HFD no era debida probablemente a alteraciones en la concentración sérica de estas hormonas. En cambio, los niveles séricos de leptina incrementaron de forma similar entre los animales controles y transgénicos, cuando ambos grupos fueron alimentados con una dieta alta en lípidos (Figura 20A). Por otro lado, los niveles circulantes de adiponectina en los ratones transgénicos en dieta estándar eran más altos que en los controles. Este incremento en la adiponectina sérica que mostraban los transgénicos obesos en dieta estándar probablemente contribuía a la ausencia de resistencia a la insulina (Figura 20B). Al someter los ratones controles a una dieta alta en lípidos, se observó un aumento en los niveles séricos de adiponectina de unas tres veces respecto a los controles en dieta estándar (Figura 20B). Sin embargo, en los animales transgénicos en dieta alta en lípidos tan sólo se producía un incremento del 30% en los niveles circulantes de adiponectina. Por ello, los ratones transgénicos en dieta HFD alcanzaban unos niveles séricos de la hormona un 30% más bajos que los de los animales controles en dieta diabetogénica (Figura 20B).

Estos resultados sugerían que el importante incremento en los niveles circulantes de adiponectina en los controles en dieta HFD probablemente contribuiría a prevenir el desarrollo de una mayor resistencia a la insulina. Sin embargo, los bajos niveles de adiponectina sérica, junto con el incremento en los niveles séricos de leptina en los ratones transgénicos en dieta alta en lípidos, contribuirían al desarrollo de la importante resistencia a la insulina observada en estos animales.

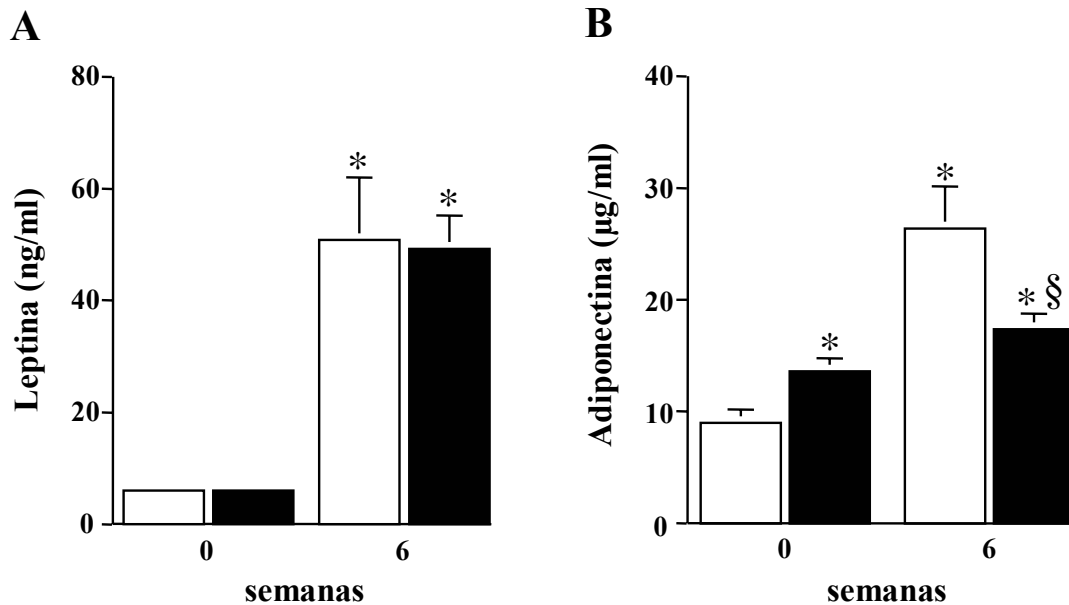


Figura 20. Niveles séricos de adipoquinas en animales alimentados, antes y después de administrarles una dieta alta en lípidos durante seis semanas. **(A)** Los niveles circulantes de leptina se determinaron mediante ELISA, tal y como se indica en Materiales y Métodos. **(B)** Los niveles circulantes de adiponectina se determinaron mediante RIA, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como las medias \pm SE de doce animales por grupo. Los controles se representan en la columna blanca mientras que los transgénicos en la columna negra * $P \leq 0.01$ vs controles en dieta estándar alimentados, § $P \leq 0.01$ vs controles en dieta alta en lípidos alimentados.

1.4.4. Estudio de los efectos de la dieta diabetogénica a nivel hepático en los animales transgénicos.

Se ha descrito que una resistencia a la insulina a nivel hepático contribuye a la hiperglucemia, debido a la falta de inhibición de la producción hepática de glucosa por la hormona, y a la hiperinsulinemia que resulta de la disminución en la eliminación de la insulina circulante por el hígado. Por ello, se estudiaron las alteraciones metabólicas en el hígado de los animales tras la exposición a una dieta alta en lípidos.

1.4.4.1. Análisis histológicos del hígado de animales en dieta alta en lípidos.

Se realizaron cortes histológicos de los hígados de animales controles y transgénicos, antes y tras una dieta alta en lípidos. En secciones teñidas con hematoxilina y eosina, no se observaron diferencias morfológicas entre el hígado de animales controles y transgénicos en dieta estándar (Figura 21). En cambio, ambos grupos de animales alimentados con una dieta HFD mostraban un mayor acúmulo de grasa en el hígado, respecto a los ratones controles en dieta estándar (Figura 21). Aunque los animales controles en dieta alta en lípidos mostraban un ligero acúmulo de lípidos en sus hepatocitos, los ratones transgénicos desarrollaban una gran esteatosis hepática (Figura 21).

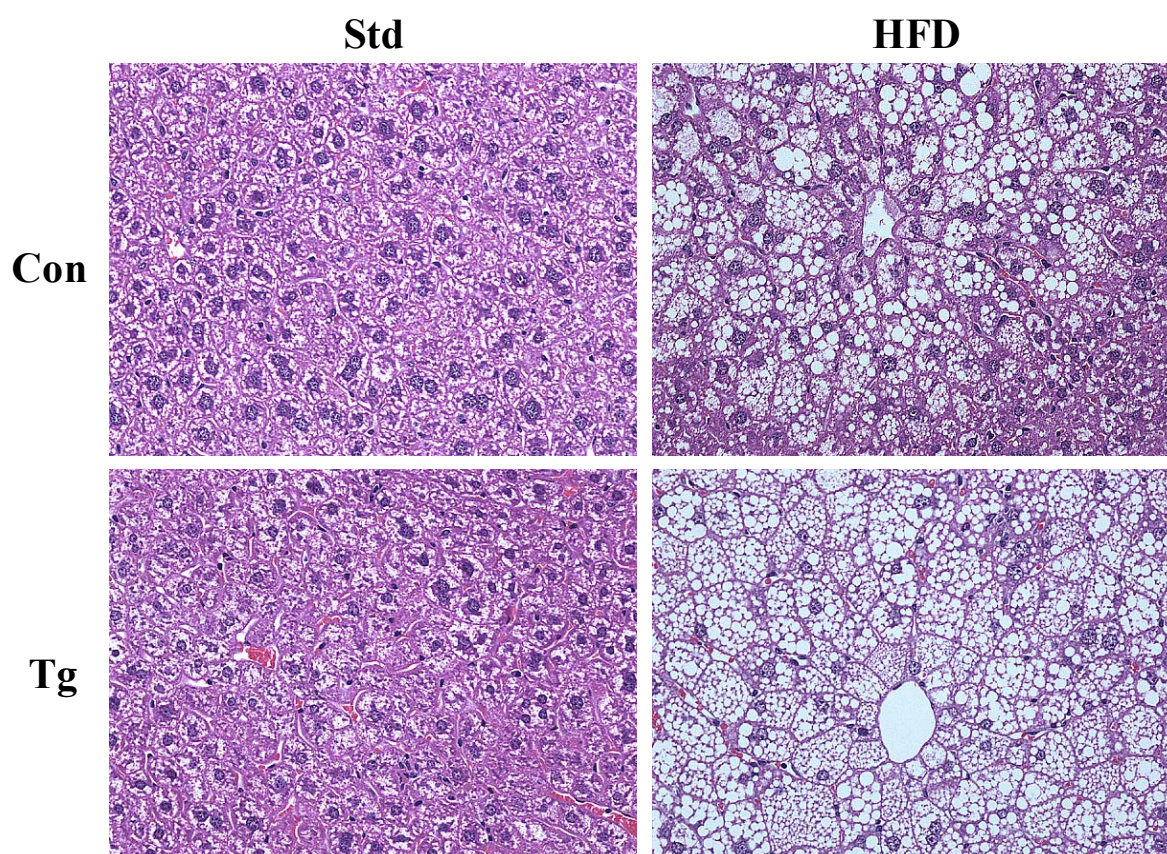


Figura 21. Cortes histológicos representativos del hígado de animales machos alimentados. Se muestran secciones del hígado de animales controles (Con) y transgénicos homocigotos (Tg), en dieta estándar (Std) y en dieta alta en lípidos (HFD). El acúmulo de lípidos en el interior de los hepatocitos se observa como un incremento del número y del tamaño de las vacuolas lipídicas (x400).

1.4.4.2. Contenido de triglicéridos en el hígado.

También se determinó el contenido de triglicéridos en los hígados de los animales controles y transgénicos. De acuerdo con la alteración morfológica observada en los cortes histológicos, el contenido hepático de triglicéridos estaba incrementado unas tres veces en los ratones controles en dieta HFD respecto a los controles en dieta estándar (Figura 22). Además, el contenido de triglicéridos hepáticos estaba incrementado unas siete veces en los transgénicos en dieta rica en lípidos respecto a los transgénicos en dieta estándar, y unas dos veces en comparación con los controles en dieta HFD (Figura 22). Estos resultados confirmaban la mayor esteatosis hepática observada microscópicamente en los transgénicos en dieta alta en lípidos. Ello sugería que un incremento en la reesterificación de FFAs en el tejido adiposo, asociado con una dieta alta en lípidos, llevaba a una hipertrigliceridemia y a un mayor acúmulo de grasa en el hígado, contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina observada en estos ratones transgénicos.

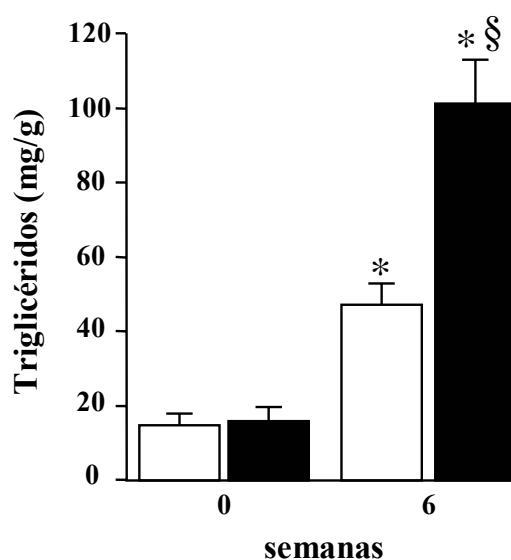


Figura 22. Contenido de triglicéridos en el hígado de animales alimentados, antes y tras seis semanas en dieta alta en lípidos. El contenido hepático de triglicéridos se determinó según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados son expresados como la cantidad de triglicéridos por gramo de hígado. Los datos representan las medias \pm SE de al menos seis animales por grupo. Los controles se representan en la columna blanca mientras que los transgénicos en la columna negra. * $P \leq 0.01$ vs controles en dieta estándar alimentados, § $P \leq 0.01$ vs controles en dieta alta en lípidos alimentados.

1.4.5. Estudio de los efectos de la dieta alta en lípidos a nivel del tejido adiposo marrón en los animales transgénicos aP2-PEPCK.

Dado que los animales transgénicos aP2-PEPCK también sobreexpresan la PEPCK en BAT, se estudió si un incremento de la reesterificación de FFAs en el BAT de animales transgénicos asociado a una dieta alta en lípidos podría contribuir a la resistencia a la insulina.

1.4.5.1. Análisis histológicos del BAT de animales tras la dieta alta en lípidos.

Se realizaron cortes histológicos del BAT de animales controles y transgénicos, antes y tras la dieta alta en lípidos. En el análisis microscópico del BAT de los animales en dieta estándar, mientras que los adipocitos marrones de los controles presentaban las vacuolas lipídicas multiloculares características, se podía apreciar un mayor acúmulo de lípidos en los adipocitos marrones de los transgénicos (Figura 23). Ello era probablemente debido al incremento en la reesterificación de FFAs en el BAT de los animales transgénicos por la sobreexpresión de la PEPCK.

Tras las seis semanas en dieta HFD, tanto en los animales controles como en transgénicos, se observó un incremento del depósito de grasa en el BAT (Figura 23). Sin embargo, el tamaño de las vesículas lipídicas multiloculares seguía siendo mayor en los animales transgénicos (Figura 23). Es más, algunos adipocitos marrones acumulaban lípidos de forma unilocular, similar a la de un adipocito blanco (Figura 23). Por tanto, el incremento en la reesterificación de FFAs, junto con el efecto de una dieta alta en lípidos, incrementaba el depósito de grasa en los adipocitos marrones, los cuales adoptaban una apariencia de adipocito blanco.

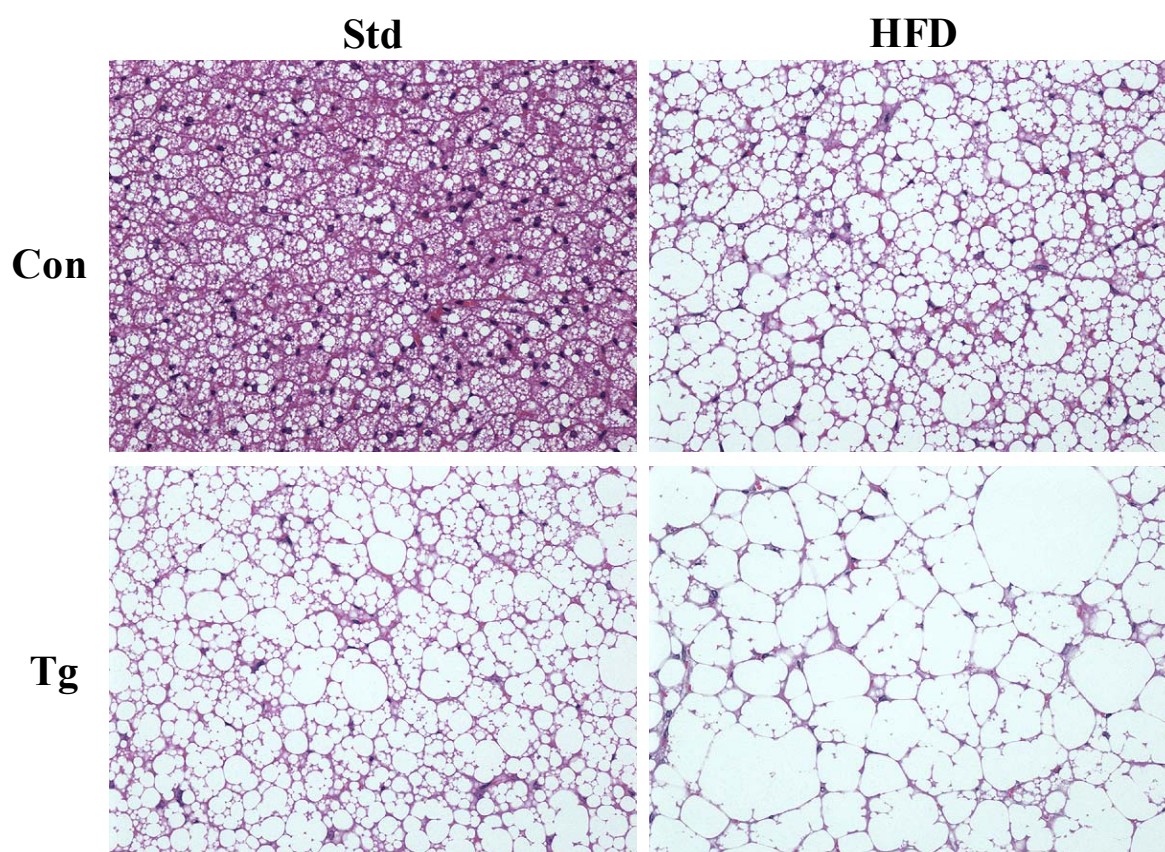


Figura 23. Cortes histológicos representativos del tejido adiposo marrón interescapular de animales machos alimentados. Se muestran secciones del BAT de animales controles (Con) y transgénicos homocigotos (Tg) en dieta estándar (Std) y en dieta alta en lípidos (HFD). Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina (x400).

1.4.5.2. Análisis de la expresión génica en BAT.

Dado que los adipocitos marrones de los animales transgénicos en dieta acumulaban más lípidos que los controles, se estudió la expresión de los genes claves en el gasto energético de este tejido. Uno de los genes más importantes es el gen *Ucp1*, el cual codifica la proteína desacopladora-1 (UCP-1), proteína expresada exclusivamente en el BAT y responsable de su capacidad termogénica. En el BAT de los animales transgénicos en dieta alta en lípidos se observó una disminución del 40% en los niveles de mRNA del gen *Ucp1*, respecto a los controles en dieta diabotogénica (Figura 24). Para profundizar en los

mecanismos moleculares responsables de la disminución en la expresión de UCP-1, también se determinó la expresión de dos reguladores positivos del gen *Ucp1*, los genes *Pparg* y *Ppargc1a*, los cuales codifican el factor de transcripción PPAR γ y su coactivador PGC-1 α , respectivamente. Los ratones transgénicos mostraban una disminución del 40% en la expresión de PPAR γ y una disminución del 30% en la expresión de PGC-1 α (Figura 24).

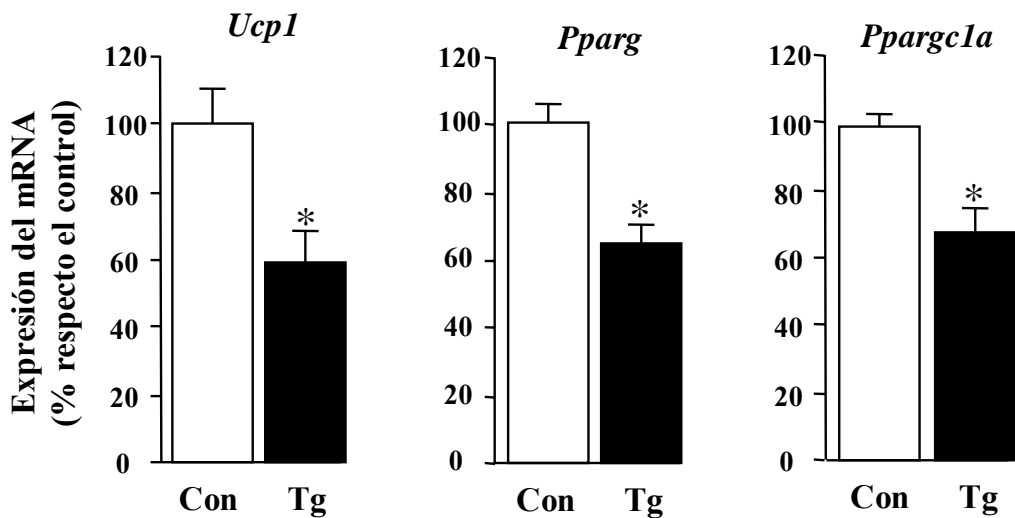


Figura 24. Expresión de los genes claves en el gasto energético del tejido adiposo marrón. Se realizaron Northern blots a partir del RNA del BAT de animales controles (Con) y transgénicos (Tg) alimentados con dieta alta en lípidos. Los Northern blots se hibridaron con sondas específicas para UCP-1, PPAR γ , PGC-1 α y 18S, tal y como se describe en los Materiales y Métodos. Las intensidades de las bandas obtenidas en las películas radiográficas se cuantificaron y se normalizaron por la cantidad de 18S. Los resultados se expresan como porcentaje respecto las cantidades de RNA de los animales controles en dieta alta en lípidos (100%). Los datos representan las medias \pm SE de al menos ocho animales por grupo. * $P \leq 0.05$ vs controles en dieta alta en lípidos alimentados.

1.4.5.3. Análisis del nivel de proteínas en BAT.

La disminución en la expresión génica de UCP-1, PPAR γ y PGC-1 α se comprobó mediante la detección de sus niveles proteicos en el tejido adiposo marrón de los animales transgénicos en dieta alta en lípidos. Al igual que sucedía con los niveles de expresión de UCP1, los animales transgénicos presentaban una reducción en los niveles de la proteína UCP1 respecto el tejido adiposo marrón de los controles (Figura 25). De igual modo, esta disminución en los niveles proteicos de UCP1 estaba acompañada de una reducción tanto en

los niveles de PPAR γ como de PGC-1 α (Figura 25). Por tanto, la disminución en la expresión y nivel de proteína de PPAR γ y PGC-1 α podrían ser las responsables de la reducción en los niveles de expresión y proteína de UCP-1 en los ratones transgénicos alimentados con la dieta diabetogénica. Ello sugería que la mayor acumulación de lípidos en el tejido adiposo marrón de los animales transgénicos provocaba un defecto en la termogénesis inducida por la dieta alta en lípidos. Este defecto en la termogénesis inducida por la dieta probablemente contribuía al desarrollo de la resistencia a la insulina en los animales transgénicos.

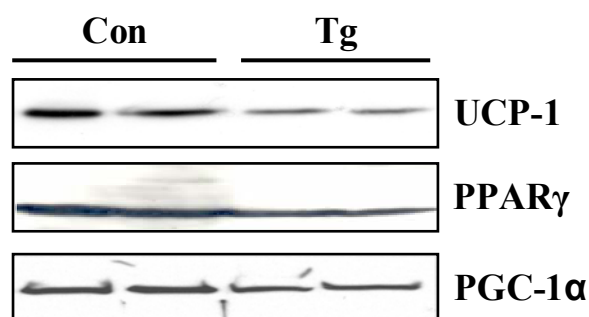


Figura 25. Análisis de los niveles de proteínas en tejido adiposo marrón. Western blots representativos del tejido adiposo marrón de animales controles (Con) y transgénicos (Tg) alimentados con una dieta alta en lípidos. Los anticuerpos utilizados y los Western blots se realizaron tal y como se describe en Materiales y Métodos.

En resumen, cuando los ratones transgénicos obesos aP2-PEPCK eran alimentados con una dieta alta en lípidos mostraban obesidad y resistencia a la insulina severas, a diferencia de los transgénicos obesos en dieta estándar que eran sensibles a la hormona. Por tanto, la dieta diabetogénica en presencia de la sobreexpresión de PEPCK en tejido adiposo parecía saturar su capacidad de almacenar grasa. Ello probablemente dificultaba su papel como tamponador del flujo de lípidos circulantes, induciendo el depósito de grasa en hígado y tejido adiposo marrón, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina (Figura 26). Es más, la acumulación de grasa en BAT reducía la termogénesis inducida por la dieta, contribuyendo a la obesidad y resistencia a la insulina. En definitiva, los resultados de los animales

transgénicos aP2-PEPCK, tanto en dieta estándar como en dieta alta en lípidos, sugieren que la regulación de la capacidad del tejido adiposo para almacenar lípidos es crucial para el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina.

TEJIDO ADIPOSEO BLANCO

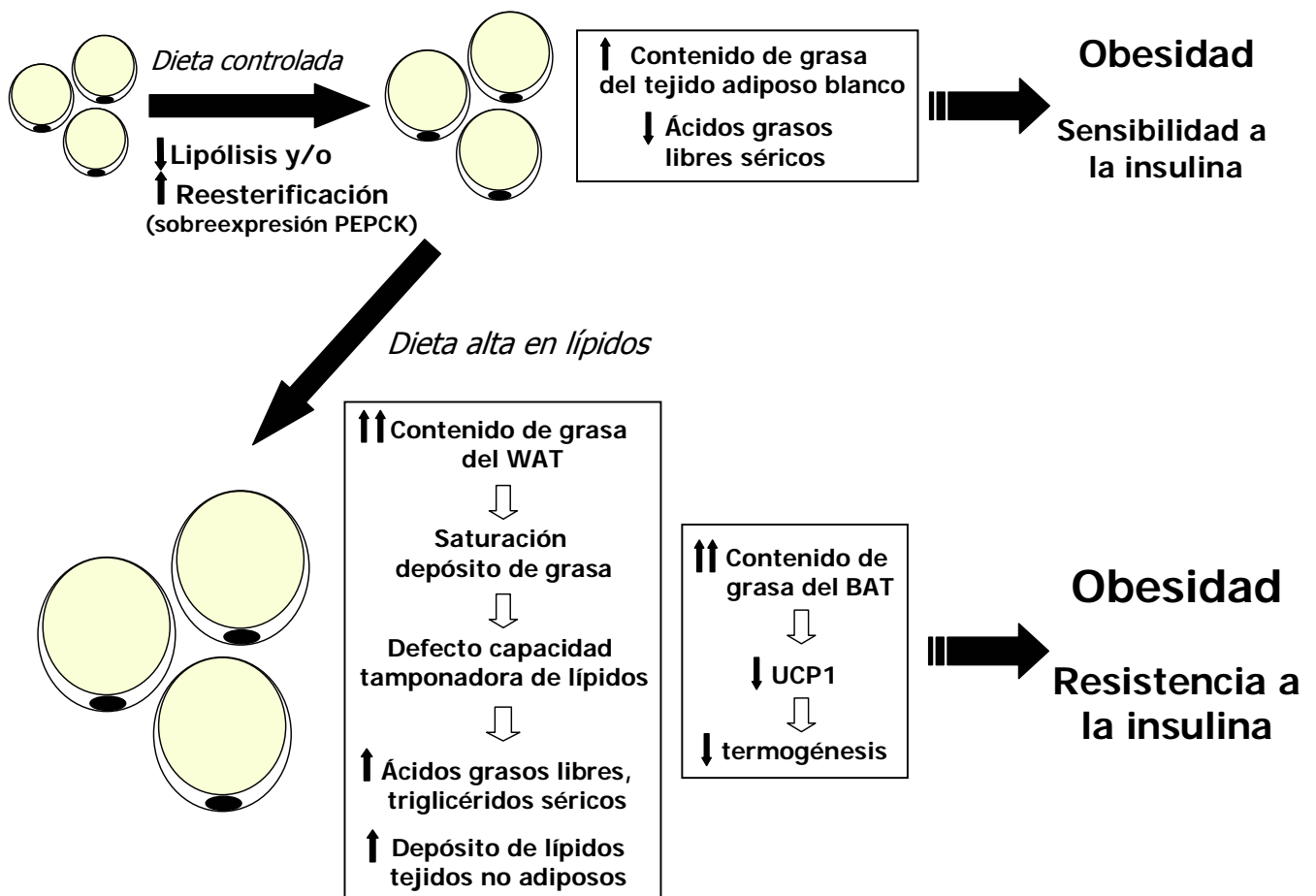


Figura 26. Efectos de la saturación de la capacidad de almacenar grasa del tejido adiposo blanco en el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina. Un incremento en la reesterificación de ácidos grasos, como el caso de los ratones transgénicos aP2-PEPCK, y/o una reducción en la capacidad lipolítica del tejido adiposo provoca un incremento en su depósito de grasa y una disminución en los niveles circulantes de ácidos grasos libres. Aunque ello induce obesidad, se mantiene la sensibilidad a la insulina. Al mantenimiento de la sensibilidad a la insulina o al desarrollo de resistencia, también contribuye la secreción de adipoquinas “estimuladoras de la sensibilidad a la insulina” como la adiponectina en nuestro caso, o “inductoras de la resistencia a la insulina”. En esta situación, la administración de una dieta alta en lípidos induce una obesidad severa con un masivo depósito de grasa en tejido adiposo, que le lleva a la pérdida de su capacidad tamponadora de lípidos circulantes. Esta pérdida aumenta los niveles circulantes de lípidos y el depósito de grasa en tejidos no adiposos, como hígado, páncreas y músculo. Tanto el incremento en los lípidos circulantes como el depósito ectópico de grasa contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina. Además, el balance adipoquinas “beneficiosas”/“nocivas” también contribuye en ello, como la ausencia del incremento en la adiponectina circulante observado en ratones aP2-PEPCK en dieta alta en lípidos respecto a los controles.

PARTE II:

**EFFECTO DEL INCREMENTO DE LA CAPTACIÓN DE
GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSEO EN LA
PRODUCCIÓN DE GLICEROL-3-FOSFATO, OBESIDAD
Y RESISTENCIA A LA INSULINA**

2.1. OBTENCIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESEN GLUCOQUINASA EN TEJIDO ADIPOSO.

Un aumento en la fosforilación de la glucosa por el tejido adiposo podría incrementar su producción de glicerol-3-fosfato y ello, a un aumento de la esterificación de ácidos grasos y del depósito de grasa. Con este fin se obtuvo un ratón transgénico que expresaba el cDNA de la glucoquinasa de rata específicamente en tejido adiposo. Para ello, se construyó un gen quimérico donde el cDNA de la glucoquinasa (GK) estuviera bajo el control del promotor *aP2*.

2.1.1. Construcción del gen quimérico *aP2*-GK.

El gen quimérico *aP2*-GK se obtuvo mediante la fusión del promotor del gen *aP2* con el cDNA de la GK de rata, junto con la cola de poliA del virus simio 40 (SV40). Para la obtención de este gen quimérico se utilizaron dos plásmidos. Un primer plásmido, *pSKII+/prom.aP2*, contenía el promotor del gen *aP2* (Ross et al., 1990) mientras que el segundo plásmido, *pPCK2.4-rGK-SV3'*, contenía la secuencia codificante de la *GK* de rata junto con la cola de poliA del SV40 (Ferre et al., 1996). Ambos plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *NotI* y *XmaI*. Tras la digestión enzimática del vector de expresión *pPCK2.4-rGK-SV3'*, se obtuvo un fragmento de 3.1 kb *XmaI/NotI* que contenía el cDNA de la GK de rata y la cola de poliA del SV40. Posteriormente, este fragmento se ligó al plásmido *pSKII+/prom.aP2* que también había sido digerido por las enzimas de restricción *NotI* y *XmaI*. De esta forma se obtuvo el vector de expresión *pSKII+/prom.aP2-rGK-SV3'*, de 11.5 kb, que contenía el gen quimérico *aP2*-GK (Figura 27).

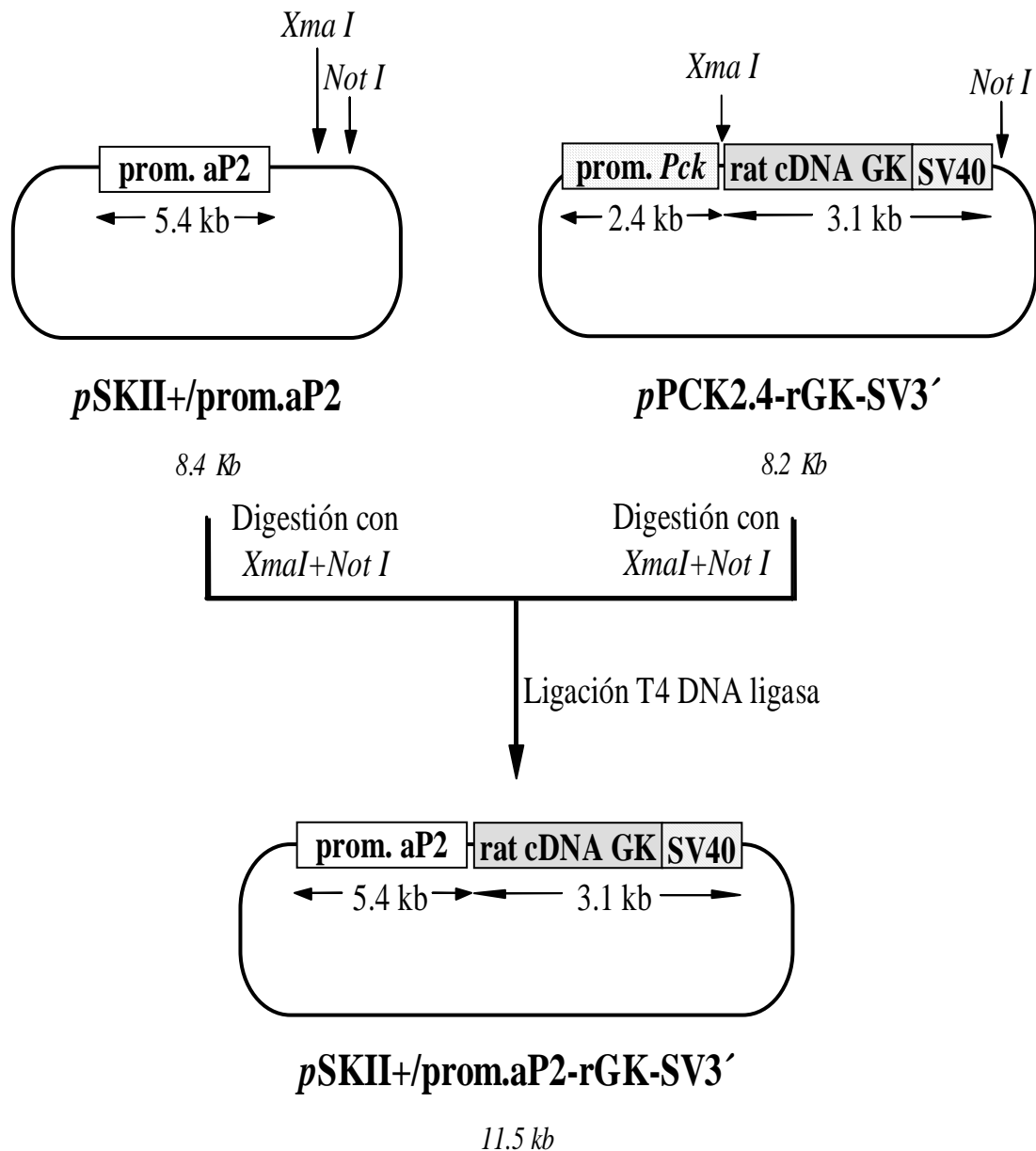


Figura 27. Construcción del plásmido *pSKII+/aP2-rGK-SV3'*. Un fragmento *XmaI-NotI* de 3.1 kb procedente del plásmido *pPCK2.4-rGK-SV3'*, que contenía la secuencia codificante completa del gen *Gck* de rata y la señal de poliadenilación del SV40, se introdujo en el plásmido *pSKII+/prom.aP2* entre las dianas *XmaI* y *NotI*, detrás del promotor del gen *aP2*. A este plásmido se le denominó *pSKII+/prom.aP2-rGK-SV3'*.

2.1.2. Obtención y genotipado de los animales transgénicos aP2-GK.

El vector de expresión ρ SKII+/prom.aP2-rGK-SV3' se digirió con la enzima de restricción *Asp718*, obteniéndose así el fragmento *Asp718-Asp718* de 8.5 kb (gen quimérico aP2-GK). Este fragmento contenía el promotor del gen *aP2*, seguido de la secuencia completa del cDNA del gen *Gck* de rata y la señal de poliadenilación del virus SV40, cuya función es la de dotar de mayor estabilidad al mRNA resultante (Figura 28). El gen quimérico se purificó por electroelución y se microinyectó en ovocitos fecundados de la cepa B6SJL F1 de ratón. Posteriormente, los ovocitos fecundados microinyectados se transfirieron a hembras receptoras (CD-1).

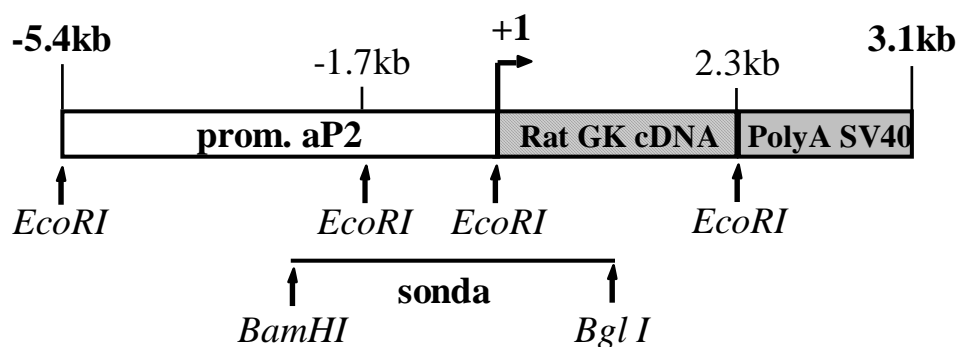


Figura 28. Representación esquemática del gen quimérico aP2-GK. El plásmido ρ SKII+/prom.aP2-rGK-SV3 se digirió con la enzima de restricción *Asp718* y el fragmento de 8.5 kb resultante de esta digestión, el cual contenía el gen quimérico aP2-GK en su totalidad, se microinyectó a ovocitos fecundados de ratón.

A las tres semanas del nacimiento, los animales se analizaron mediante análisis por Southern blot para detectar la presencia del transgen aP2-GK. Tras hibridar con la sonda marcada radiactivamente, se detectaron dos ratones machos transgénicos, a partir de los cuales se establecerían dos líneas independientes de ratones transgénicos aP2-GK (Tg1 y

Tg2). En la realización de este trabajo se utilizaron animales transgénicos heterocigotos de la segunda generación de descendientes (F2) de los animales fundadores.

Todos los animales se analizaron mediante análisis por Southern blot. Tras la hibridación con la sonda específica, los animales transgénicos heterocigotos de ambas líneas presentaban tres bandas específicas del transgen, cuyos tamaños eran de 3.7 kb, 2.3 kb y 1.7 kb respectivamente (Figura 29). Los ratones transgénicos heterocigotos de la línea 2 (Tg2) presentaban un mayor número de copias del transgen respecto a los de la línea 1 (Tg1).

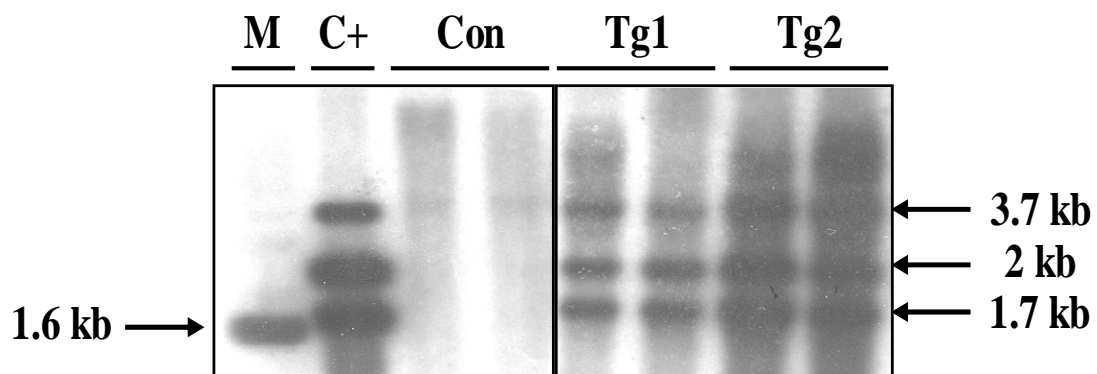


Figura 29. Southern blot representativo de DNA genómico. Análisis por Southern blot del DNA genómico digerido con *EcoRI* de ratones controles (Con) y transgénicos heterocigotos de las líneas 1 (Tg1) y 2 (Tg2). La sonda específica para el transgen correspondía al fragmento *BamHI-Bgl I* de 3.5 kb que contenía las últimas 2 kb de la secuencia del promotor del gen *aP2* y las primeras 1.5 kb de la secuencia del cDNA de la GK. (M) Marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder, (C+) Digestión del plásmido *pSKII+/prom.aP2-rGK-SV3* con la enzima *EcoRI* (control positivo).

2.1.3. Análisis de la expresión del transgen aP2-GK.

La expresión del transgen aP2-GK se analizó mediante Northern blot en diferentes tejidos de ambas líneas de transgénicos. Para ello, se extrajo el RNA total del tejido adiposo blanco epididimal (WAT), tejido adiposo marrón interescapular (BAT) e hígado, tanto de animales controles como transgénicos heterocigotos Tg1 y Tg2 (Figura 30). Tras hibridar los Northern blot, se observó que tan sólo en el tejido adiposo (blanco y marrón) de ambos ratones transgénicos se detectaba la presencia de un transcrito de 3.1 kb, correspondiente al transgen (cDNA de la GK rata más la cola de poliadenilación del SV40). Por el contrario, el tejido adiposo blanco y marrón de los ratones controles no mostraban la presencia de ningún transcrito de la GK (Figura 30). Las dos líneas de ratones transgénicos presentaban diferentes niveles de expresión del transgen, siendo los ratones transgénicos Tg2 los que mostraban una mayor expresión, tanto en WAT como en BAT (Figura 30). Por tanto, además de presentar un mayor número de copias integradas del transgen, los Tg2 presentaban una mayor expresión de la GK en tejido adiposo. No se observaron cambios en los niveles del mRNA de la GK en hígado (Figura 30).

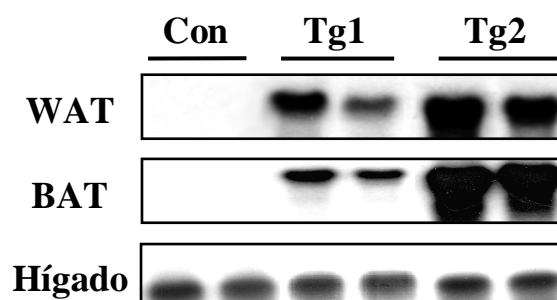


Figura 30. Expresión del transgen en WAT y BAT. Northern blot representativos del tejido adiposo blanco (WAT), tejido adiposo marrón interescapular (BAT) e hígado de ratones alimentados controles (Con) y transgénicos heterocigotos (Tg1 y Tg2), hibridados con una sonda específica para la GK. Para los Northern blot del WAT y BAT se analizaron 10 μ g de RNA, mientras que se analizaron 20 μ g de RNA para el del hígado.

2.1.4. Determinación de la presencia de glucoquinasa en tejido adiposo blanco.

A continuación se realizó un análisis por Western blot para determinar la presencia de la proteína GK en tejido adiposo blanco. Para ello, se extrajeron las proteínas totales del WAT epididimal y del hígado, tanto de controles como de transgénicos Tg2. Para la detección de la proteína, se utilizó un anticuerpo específico contra la proteína GK hepática murina. En el WAT de los ratones transgénicos Tg2 se detectó la presencia de una proteína de 52 kDa de tamaño, correspondiente a la GK hepática, ausente en el WAT de los animales controles (Figura 31). Sin embargo, la cantidad de proteína GK producida por el WAT era sensiblemente inferior a los niveles hepáticos de la proteína endógena. Además, los niveles de GK endógena en el hígado de los ratones transgénicos no estaban alterados por la presencia de la GK en WAT (Figura 31).

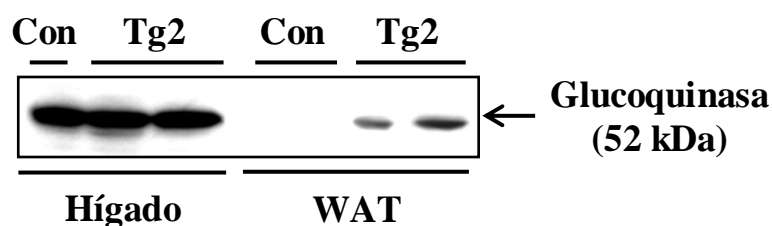


Figura 31. Expresión de la proteína GK en WAT e hígado. Western blot representativo del tejido adiposo blanco (WAT) e hígado de machos alimentados controles (Con) y transgénicos heterocigotos de la línea 2 (Tg2), utilizando un anticuerpo de oveja específico para la GK hepática murina. La proteína transgénica presenta el mismo tamaño que la GK hepática endógena (52 kDa).

2.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE GK EN EL TEJIDO ADIPOSO.

2.2.1. Utilización basal de glucosa *in vivo* por el tejido adiposo blanco y músculo esquelético.

En animales alimentados, se determinó la captación y utilización de la glucosa *in vivo* por el WAT epididimal y músculo esquelético, en condiciones basales. Se observó que los ratones transgénicos presentaban un incremento significativo, de unas 3 veces, en la captación y utilización basal de [2-³H]-deoxiglucosa por el WAT (Figura 32). Sin embargo, los ratones transgénicos mostraban una captación y utilización basal de [2-³H]-deoxiglucosa por el músculo esquelético similar a los controles, ya fuera el músculo cuádriceps o el gastrocnemio (Figura 32). Estos resultados sugerían que la expresión de GK en tejido adiposo blanco incrementaba su utilización basal de glucosa, sin alterar el metabolismo basal de la glucosa por el músculo esquelético.

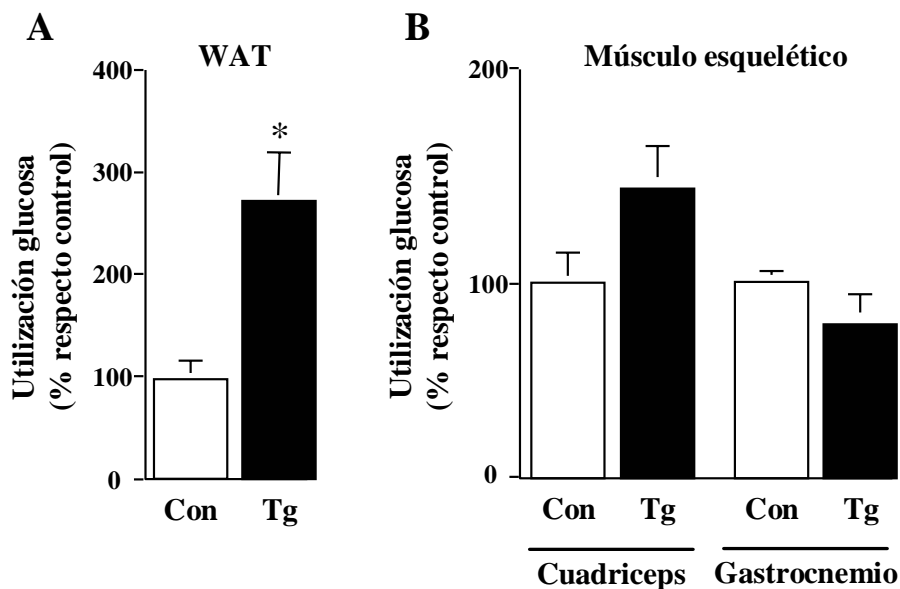


Figura 32. Índice de la utilización de la glucosa en tejido adiposo blanco y músculo esquelético. La captación de glucosa se determinó en WAT epididimal y músculo esquelético (gastrocnemio y cuádriceps), tal y como se describe en Materiales y Métodos. **(A)** Utilización basal de glucosa por el WAT. Los resultados se expresan como porcentaje de la utilización basal de glucosa por el WAT de animales controles (302.13 pmol x mg proteína⁻¹ x min⁻¹). **(B)** Utilización basal de la glucosa por el cuádriceps y gastrocnemio. Los resultados se expresan como porcentaje de la utilización basal de glucosa por el cuádriceps y gastrocnemio de animales controles (86.04 pmol x mg proteína⁻¹ x min⁻¹ y 117.31 pmol x mg proteína⁻¹ x min⁻¹, respectivamente). Todos los resultados representan la media ±SE de cuatro animales por grupo. * *P* < 0.05.

2.2.2. Análisis del peso corporal, peso del tejido adiposo epididimal y contenido de grasa corporal.

En animales de cuatro meses de edad se determinó el peso corporal, el peso del tejido adiposo blanco epididimal y el contenido de grasa corporal. En ninguno de estos parámetros estudiados se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones transgénicos y controles (Figura 33). A pesar de la mayor capacidad de utilizar la glucosa que presentaba el tejido adiposo de los animales transgénicos, no se alteraba ni la cantidad de grasa acumulada ni el peso corporal en estos animales.

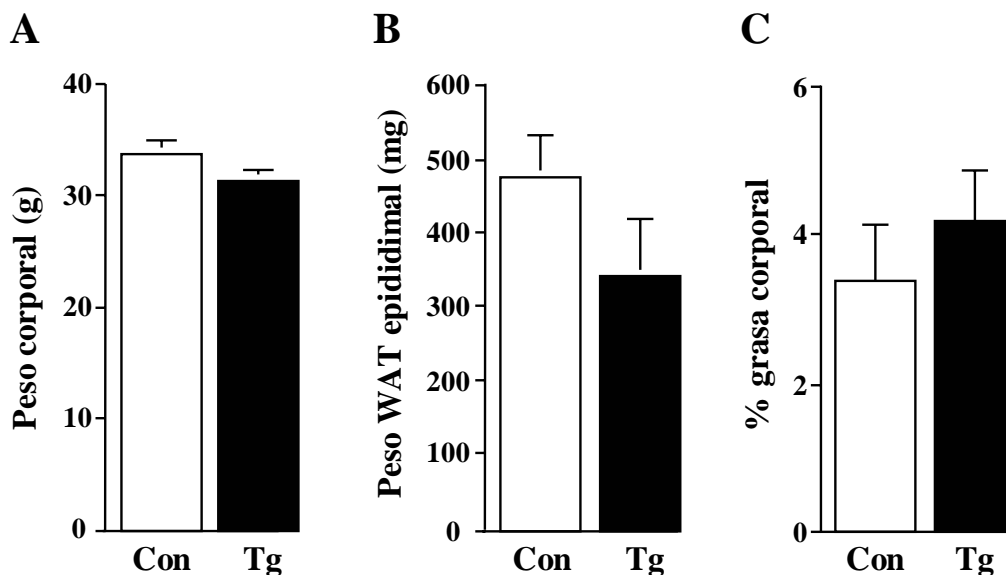


Figura 33. Peso corporal, peso del tejido adiposo blanco epididimal (WAT) y porcentaje de grasa corporal. (A) Peso corporal de machos de cuatro meses de edad controles (Con) y transgénicos heterocigotos (Tg). (B) Peso del tejido adiposo epididimal (WAT) de machos controles y transgénicos. (C) Porcentaje de grasa corporal de controles y transgénicos. Los resultados se expresan como media \pm SE de al menos ocho animales por grupo.

2.2.3. Estudio histológico del tejido adiposo blanco.

Los análisis histológicos del tejido adiposo blanco epididimal no mostraban diferencias de tamaño entre los adipocitos blancos de los animales transgénicos y los de los controles (Figura 34). Para profundizar en el estudio, se realizó un estudio morfométrico en

ambos grupos de animales. No sólo se determinó el tamaño de los adipocitos blancos sino la distribución del tamaño de éstos en un histograma (Figura 34). No se observaron diferencias en el tamaño medio de los adipocitos blancos epididimales entre animales transgénicos y controles ($940 \pm 743 \mu\text{m}^2$ y $1024 \pm 812 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Como se muestra en el histograma, los adipocitos blancos epididimales de un animal control se distribuyeron de forma que el 80% presentaba un tamaño menor a $2000 \mu\text{m}^2$, siendo los más abundantes los comprendidos entre $1000\text{-}2000 \mu\text{m}^2$ (el 30%). En los animales transgénicos se observó una distribución de los tamaños de los adipocitos muy similar a los controles (Figura 34).

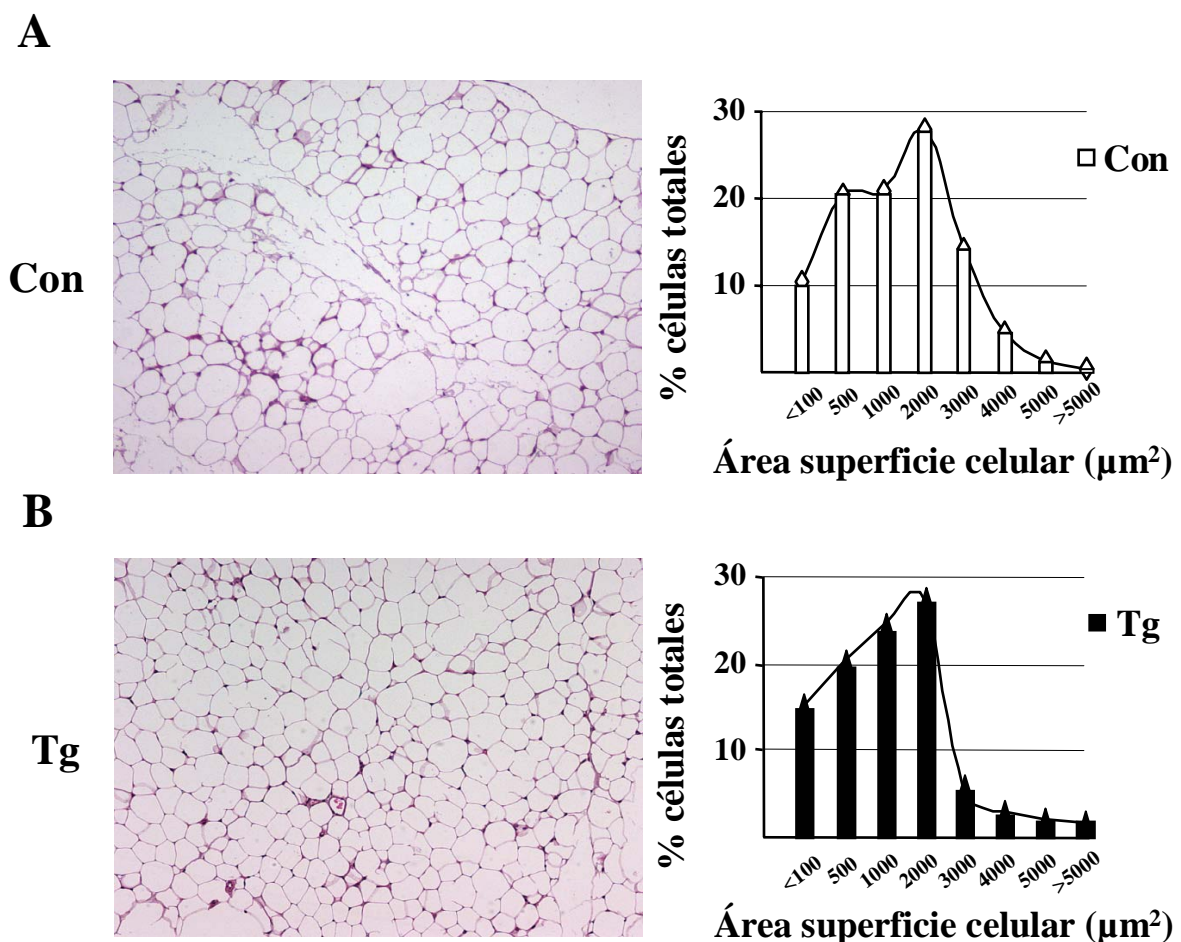


Figura 34. Análisis histológico y morfométrico del tejido adiposo blanco epididimal. Secciones representativas del WAT epididimal de animales controles (Con) y transgénicos (Tg) alimentados teñidas con hematoxilina y eosina ($\times 100$). **(A)** Análisis morfométrico de los adipocitos blancos epididimales de animales controles. **(B)** Análisis morfométrico de los adipocitos blancos epididimales de animales transgénicos. Los adipocitos analizados se agruparon según su área (μm^2). El histograma representa el porcentaje de los distintos grupos de adipocitos respecto al total analizado. Los resultados se obtuvieron a partir del análisis morfométrico de 3748 adipocitos controles y 5015 adipocitos transgénicos.

2.2.4. Determinación de la producción de glicerol-3-fosfato y síntesis *de novo* de lípidos a partir de la glucosa.

Dado que el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos presentaba una mayor utilización de la glucosa, se estudió la síntesis de lípidos y la producción de glicerol-3-P a partir de la glucosa en fragmentos de WAT epididimal de animales controles y transgénicos aP2-GK. La conversión de D-[U-¹⁴C]-glucosa a lípidos en los animales transgénicos era similar al de los animales controles (Figura 35). Además, tampoco se observó ningún cambio significativo en la conversión de D-[U-¹⁴C]-glucosa a glicerol-3-P en los animales transgénicos (Figura 35). A pesar del incremento en la utilización basal de glucosa por el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos aP2-GK, estos resultados indicaban que su síntesis *de novo* de lípidos y la producción de glicerol-3-P a partir del azúcar no se modificaban en estos animales.

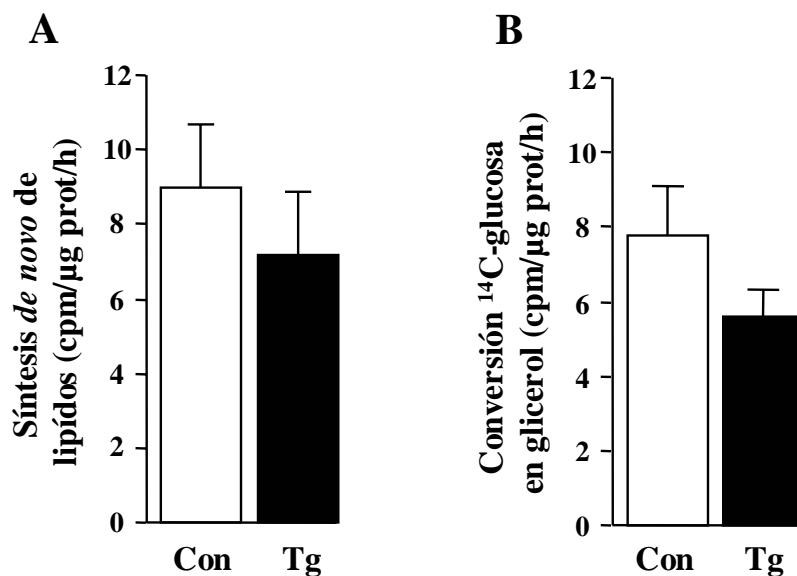


Figura 35. Síntesis *de novo* de lípidos y producción de glicerol-3-P a partir de la glucosa. A partir de fragmentos de WAT epididimal de animales controles y transgénicos alimentados, se determinó la producción de lípidos (A) y de glicerol-3-P (B) a partir de D-[U-¹⁴C]-glucosa, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como cpm x μg proteína⁻¹ x hora⁻¹. Los datos se representan como la media ±SE de cuatro animales por grupo.

2.2.5. Análisis por resonancia magnética nuclear del destino de la glucosa en WAT.

A continuación se utilizó la técnica de la resonancia magnética nuclear (RMN) para estudiar el destino de la glucosa en el WAT de animales transgénicos. Para ello, se inyectó [1-¹³C]-glucosa intraperitonealmente a ratones controles y transgénicos y se realizó la RMN de ¹³C a partir de los extractos perclóricos del WAT. Cualitativamente, se observó que el espectro de ¹³C de los extractos acuosos del WAT epididimal de los animales transgénicos presentaba una mayor intensidad en la posición 21 ppm, respecto al espectro de los animales controles. Esta posición corresponde al Carbono 3 del lactato (C3 del lactato) (Figura 36). En ambos grupos se determinó la relación entre las intensidades de los diferentes compuestos existentes en WAT, especialmente [3-¹³C]-lactato y [1-¹³C]-glucosa, y se estandarizó por la cantidad de WAT epididimal utilizada en ambos extractos. Tras la estandarización, se observó que el WAT de animales transgénicos presentaba un incremento, de aproximadamente 2.2 veces, en la producción de lactato a partir de la glucosa con respecto a los controles (0.0109 x gramo⁻¹ en transgénicos por 0.0049 x gramo⁻¹ en controles). En la RMN no se observó un incremento en la cantidad de glucosa captada por el WAT de los ratones transgénicos (0.668 x gramo⁻¹ en transgénicos respecto 0.805 x gramo⁻¹ de controles), a pesar del mayor índice de utilización de glucosa por el WAT observado anteriormente (Figura 32). Mientras que el análogo de la glucosa [2-³H]-deoxiglucosa se acumula en los tejidos una vez fosforilado, la [1-¹³C]-glucosa se metaboliza rápidamente, sin acumularse. Así, la ausencia del incremento en la cantidad de [1-¹³C]-glucosa en WAT de animales transgénicos observada en la RMN podría significar que el WAT de estos ratones metabolizaba rápidamente la glucosa que captaba, a pesar de que captaran más. Ello sugería una mayor capacidad de fosforilación de la glucosa en los animales transgénicos debida a la expresión de la glucoquinasa en este tejido.

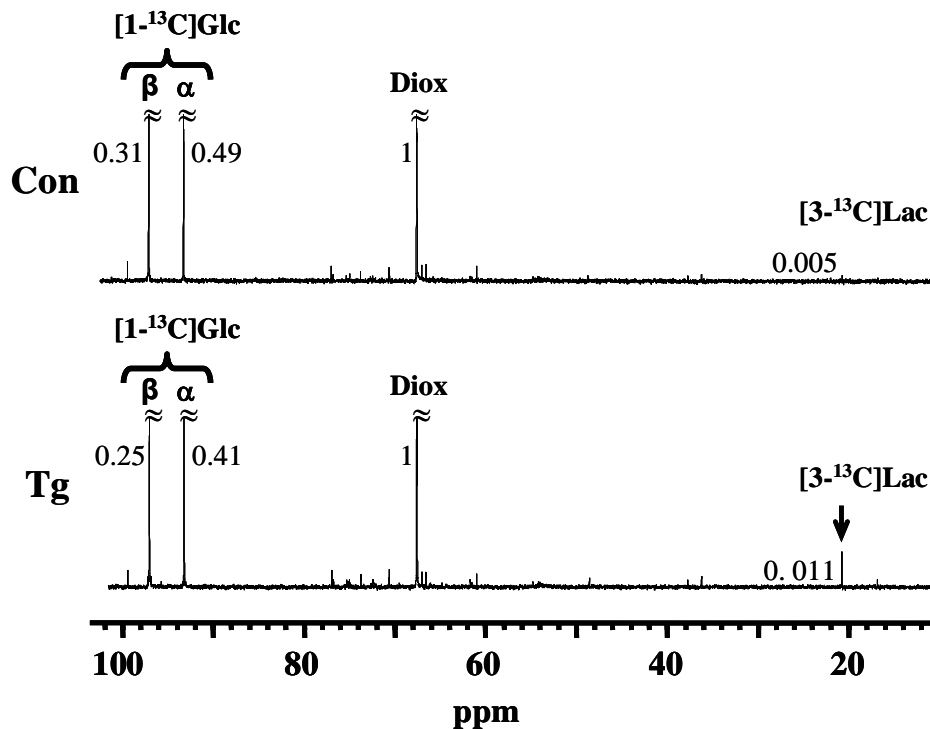


Figura 36. Resonancia magnética nuclear del tejido adiposo blanco epididimal. Tras la inyección intraperitoneal de $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa, se realizó una RMN de ^{13}C a partir de los extractos acuosos del WAT epididimal de animales controles (A) y transgénicos (B) alimentados. Cada uno de los espectros se obtuvo a partir de la mezcla de los extractos correspondientes a cinco animales por grupo, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las posiciones de las diferentes moléculas en el espectro son: C3 del lactato (21 ppm), dioxano (compuesto de referencia, 67.4 ppm), α $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa (92 ppm) y β $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa (96 ppm). Se remarca la posición del C3 del lactato en el espectro de los animales transgénicos. Los números indican la relación entre las intensidades de las distintas moléculas respecto al dioxano.

A partir de la RMN de ^{13}C de una solución estándar se determinó la concentración de lactato intracelular en el tejido adiposo blanco epididimal de ambos grupos de animales. El tejido adiposo blanco epididimal de ratones transgénicos presentaba un incremento, de aproximadamente dos veces respecto a los controles, en la producción de lactato a partir de la glucosa captada (Tabla 3). Este aumento en la concentración intracelular de lactato en animales transgénicos era similar al incremento en la utilización de glucosa por el tejido adiposo observado anteriormente. Por tanto, estos resultados sugerían que el destino de la mayor captación y utilización basal de glucosa por el tejido adiposo blanco de ratones transgénicos era la síntesis de lactato, tal y como se muestra en el esquema (Figura 37)

	Lactato (nmol/g)	Glucosa (nmol/g)
Con	2.59	444.81
Tg	5.75	368.80

Tabla 3. Concentración de lactato intracelular en tejido adiposo blanco epididimal. A partir de los espectros de RMN de ^{13}C de extractos acuosos del tejido adiposo blanco de animales controles (Con) y transgénicos (Tg), se determinó la concentración de lactato intracelular mediante la utilización de un espectro de una solución estándar. Los resultados se expresaron como nanomoles x gramo de tejido $^{-1}$. Los datos representan el valor total de cinco animales por grupo.

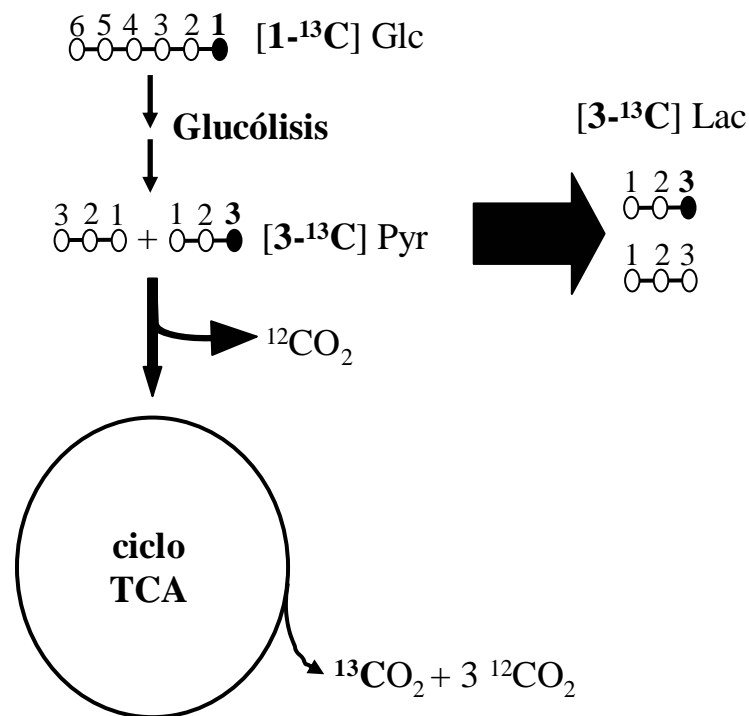


Figura 37. Esquema de las vías metabólicas y el destino de la $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa. A través de la glucólisis, el ^{13}C de la $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa aparece como carbono en posición 3 de una de las moléculas de piruvato ($[3-^{13}\text{C}]$ -Pyr). Posteriormente, éste puede ser transformado en lactato, apareciendo el ^{13}C en la posición 3 del lactato ($[3-^{13}\text{C}]$ -Lac) o bien entrar en el ciclo tricarboxílico (TCA), donde finalmente es liberado en forma de $^{13}\text{CO}_2$ en alguna de las descarboxilaciones del ciclo. Según los resultados obtenidos en la RMN del WAT de animales controles y transgénicos, los ratones transgénicos presentaban un incremento, de aproximadamente dos veces, en la glucólisis anaerobia (formación de lactato).

2.2.6. Consumo de glucosa y producción de lactato *in vitro* por el tejido adiposo blanco epididimal.

Para confirmar los resultados de la RMN se determinó la producción de lactato *in vitro* a partir de glucosa por el tejido adiposo blanco epididimal, incubándolo en un medio con dos concentraciones diferentes de glucosa, 2 mM y 20 mM. La concentración de glucosa 2 mM se utilizó como concentración basal de glucosa, ya que a esta concentración tan sólo son activas las hexoquinasas I y II. Sin embargo, a una concentración de 20 mM de glucosa, la hexoquinasa más activa es la glucoquinasa. En ambas concentraciones se observó una disminución de los niveles de glucosa del medio en animales controles y transgénicos. Cuando la concentración de glucosa del medio era de 2 mM de glucosa, no se observaron diferencias entre los animales transgénicos y controles, tanto en el consumo de glucosa como en la producción de lactato liberado al medio (resultados no mostrados). Por el contrario, con una concentración de 20 mM y transcurridos 30 minutos de incubación, se observó un incremento significativo de casi dos veces en el consumo de glucosa del medio por el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos (Figura 38A). Además, la liberación de lactato al medio por el tejido adiposo era significativamente mayor en los animales transgénicos, tanto en el minuto 30 de incubación como en el 90. Así, la producción de lactato por el tejido adiposo estaba incrementada significativamente unas tres veces en los animales transgénicos a los 30 minutos de incubación (Figura 38B). Este incremento se mantenía a los 90 minutos de incubación (Figura 38B).

Estos resultados *in vitro* sugerían que el tejido adiposo blanco aislado de los animales transgénicos aP2-GK producía y liberaba más lactato al medio a partir de un mayor consumo de glucosa. Además, este incremento en la producción de lactato tan sólo ocurría a concentraciones elevadas de glucosa en el medio, condiciones en las que se produce la activación de la glucoquinasa ($K_m > 8$ mM).

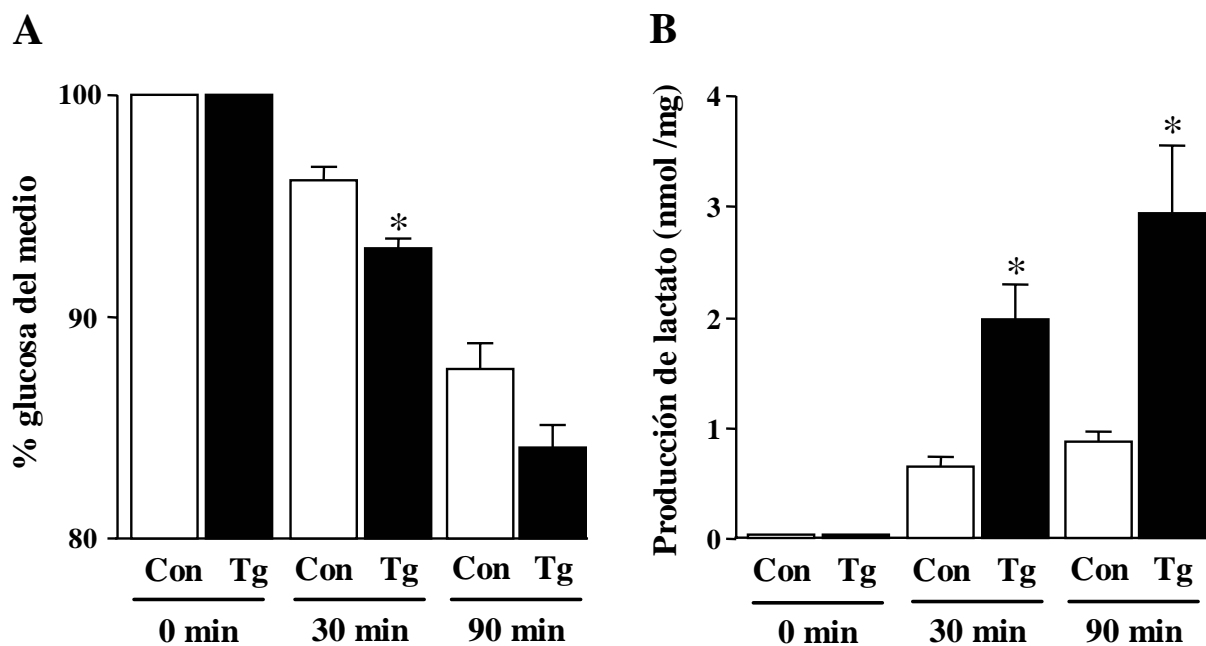


Figura 38. Consumo de glucosa y producción de lactato *in vitro* por el tejido adiposo blanco epididimal. La incubación del tejido adiposo blanco de animales controles (Con) y transgénicos (Tg) se realizó tal y como se indica en Materiales y Métodos. Se determinó el consumo de glucosa (**A**) y la liberación de lactato al medio (**B**) por el tejido adiposo blanco a los 30 y 90 minutos de incubación, cuando el tejido adiposo blanco era incubado a 20 mM de glucosa. El consumo de glucosa del medio se expresa como porcentaje de la concentración inicial de glucosa y la liberación de lactato al medio se expresa como nanomoles de lactato x mg WAT⁻¹. Ambos resultados se representan como la media \pm SE de al menos cinco animales por grupo. * $P < 0.05$.

2.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS SISTÉMICOS DE LA EXPRESIÓN DE GK EN EL TEJIDO ADIPOSO.

2.3.1. Determinación de los niveles circulantes de lactato.

Dada la mayor producción de lactato por el tejido adiposo blanco de los ratones transgénicos observada *in vitro*, se determinaron los niveles circulantes de lactato en animales controles y transgénicos, tanto en condiciones de alimentación como en ayunas (Figura 39). Se observó un incremento significativo, alrededor del 50%, en la concentración de lactato circulante en condiciones de alimentación en los animales transgénicos respecto a los controles (Figura 39). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles circulantes de lactato en ayunas, aunque se observó una tendencia a estar incrementada en los ratones transgénicos (Figura 39).

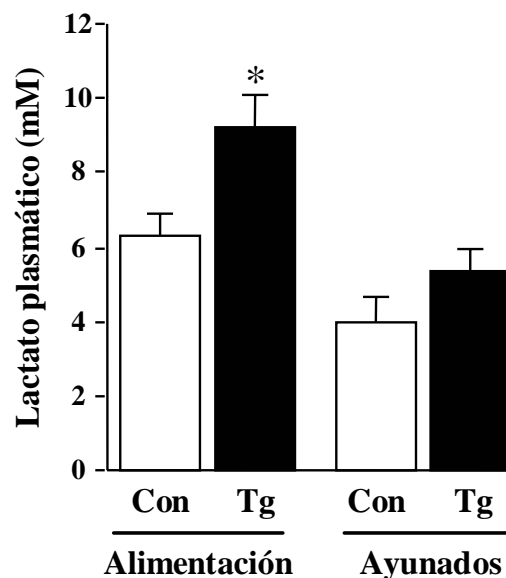


Figura 39. Determinación de los niveles circulantes de lactato. A partir de la vena de la cola de ratones controles (Con) y transgénicos (Tg) alimentados y ayunados, se recogió sangre y se determinaron los niveles plasmáticos de lactato tal y como se describe en los Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm SE de al menos seis animales por grupo. * $P < 0.05$.

2.3.2. Test de tolerancia a la glucosa.

Se realizó un test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa para valorar si un incremento en la utilización basal de glucosa por el tejido adiposo blanco en los animales transgénicos podría incrementar su tolerancia al azúcar. Tras la inyección intraperitoneal de 1 gramo de glucosa por kg de peso, los ratones transgénicos mantenían siempre su glucemia por debajo de la alcanzada por los controles (Figura 40A). Incluso si se administraban 2 gramos de glucosa por kg de peso, los animales transgénicos mantenían una eliminación más rápida de la glucosa respecto a los controles (Figura 40B). Ello indicaba que los animales transgénicos aP2-GK presentaban una mayor tolerancia a la glucosa, probablemente debido al incremento en la utilización del azúcar por el tejido adiposo blanco como consecuencia de su expresión de glucoquinasa.

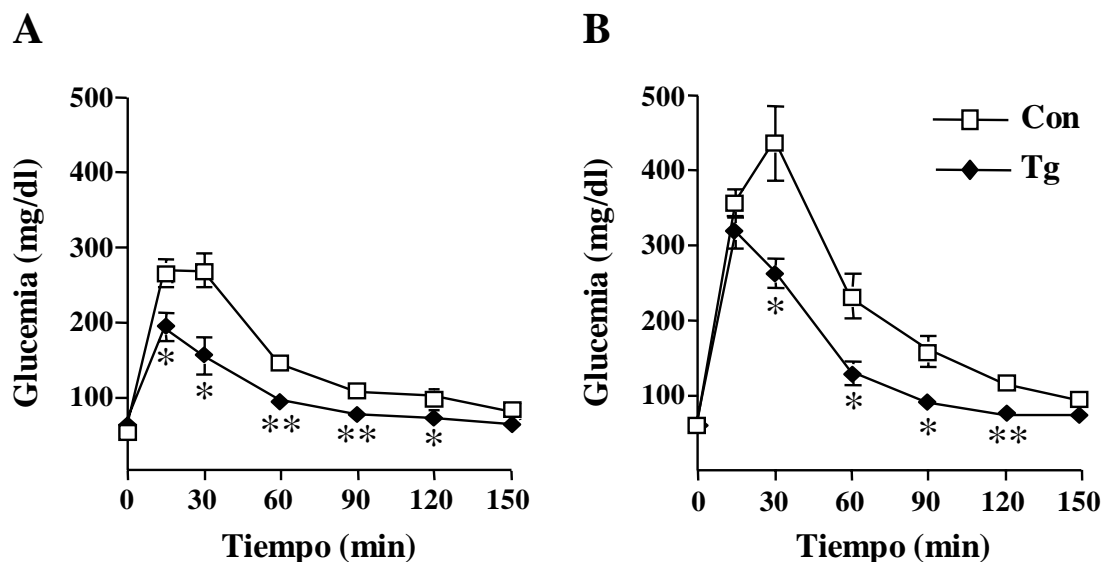


Figura 40. Test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa. El test de tolerancia a la glucosa se realizó en ratones controles y transgénicos, tal y como se describe en los Materiales y Métodos. Se inyectó intraperitonealmente 1 gramo de glucosa por kg de peso (A) o 2 gramos de glucosa por kg de peso (B) y se determinó la glucemia en los animales a los tiempos indicados. Los resultados se presentan como medias \pm SE de al menos ocho animales por grupo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3.3. Test de tolerancia a la insulina.

También se estudió la sensibilidad a la insulina en los animales transgénicos aP2-GK. Para ello, se inyectó intraperitonealmente una dosis de insulina (0.75 U/kg) a animales alimentados despiertos (Figura 41A). Se observó que la glucemia inicial de animales controles y transgénicos alimentados era similar (Figura 41A). En los controles, la inyección de la hormona provocaba una rápida disminución de la glucemia inicial. A los 30 minutos, ésta alcanzaba unos niveles de aproximadamente el 40 % de la inicial, y aún se mantenía por debajo a los 60 minutos (Figura 41A). En los transgénicos, la respuesta a la insulina era similar a los controles (Figura 41A). Para determinar si los animales transgénicos eran más sensibles a la hormona, se les inyectó una dosis de 0.375 U insulina/kg. Esta dosis provocaba una reducción de la glucemia inicial, similar a la dosis anterior, pero una rápida recuperación de los niveles basales en los controles (Figura 41B). Aunque los animales transgénicos mostraron una reducción de la glucemia similar, su recuperación era más lenta (Figura 41B). Ello sugería que los animales transgénicos mostraban un incremento en la sensibilidad a la insulina, probablemente debido a una mayor utilización basal de la glucosa por el WAT.

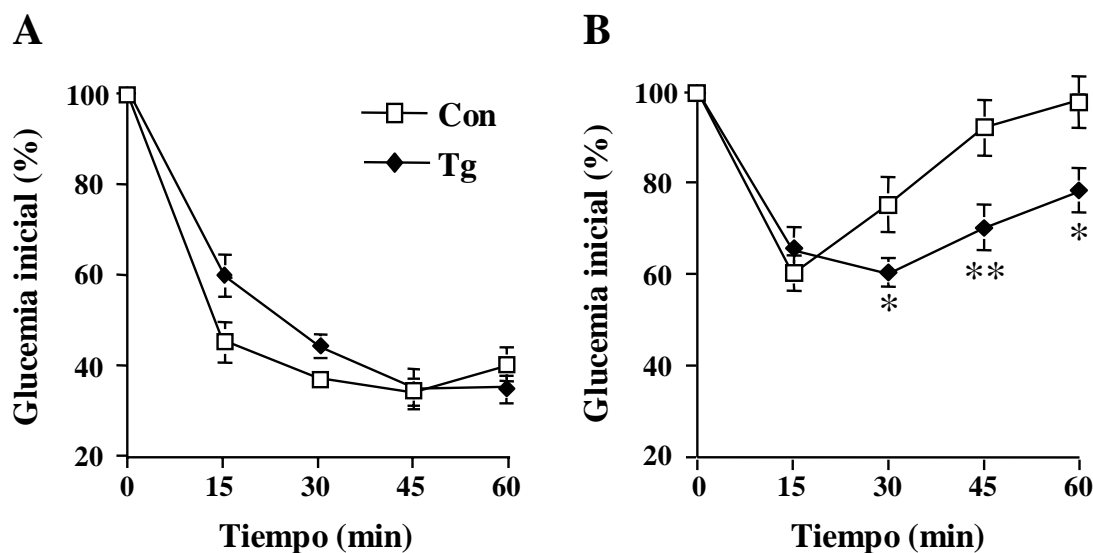


Figura 41. Test intraperitoneal de tolerancia a la insulina. El test de tolerancia a la insulina se realizó en animales controles y transgénicos, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Se inyectó intraperitonealmente 0.75 U de insulina por kg (A) o 0.375 U de insulina por kg de peso (B) y se determinó la glucemia en los animales a los tiempos indicados. Los resultados se presentan como porcentaje respecto la glucemia a tiempo 0 para cada animal y se presentan como medias \pm SE de al menos ocho animales por grupo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3.4. Análisis de los metabolitos sanguíneos.

También se determinó la concentración de diferentes metabolitos sanguíneos en animales controles y transgénicos, tanto en condiciones de alimentación como en ayunas (Tabla 4). A pesar del incremento en la utilización basal de glucosa por el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos, no se observaron diferencias en la glucemia respecto a los animales controles, tanto en condiciones de alimentación como en ayunas (Tabla 4). Además, los animales transgénicos mostraban unos niveles séricos de triglicéridos y de ácidos grasos libres (FFAs) similares a los de un animal control en ambas condiciones (Tabla 4). Tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en la concentración sérica de cuerpos cetónicos, determinada como niveles circulantes de D-3-hidroxiacetato (Tabla 4).

		Glucosa (mg/dl)	TG (mg/dl)	FFAs (mM)	D-3-H (mM)
Alimentados	Con	134 ± 9	136 ± 25	0.9 ± 0.15	1.04 ± 0.17
	Tg	128 ± 5	113 ± 31	1.1 ± 0.08	0.79 ± 0.11
Ayunados	Con	73 ± 5	95 ± 8	1.9 ± 0.15	n.d.
	Tg	69 ± 3	94 ± 10	1.8 ± 0.14	n.d.

Tabla 4. Determinación de los niveles circulantes de diferentes metabolitos. A partir de la vena de la cola de ratones controles (Con) y transgénicos (Tg) alimentados y ayunados, se recogió sangre y se determinaron los niveles de metabolitos circulantes, tal y como se describe en los Materiales y Métodos. Los datos representan la media ±SE de al menos seis animales por grupo. TG: Triglicéridos; FFAs: ácidos grasos libres; D-3-H: D-3-hidroxiacetato.

2.3.5. Determinación de los niveles circulantes de hormonas.

A continuación se determinaron los niveles circulantes de insulina y de dos adipoquinas, la leptina y la adiponectina. Los animales transgénicos aP2-GK presentaban una insulinemia similar a la de los controles, tanto en ayunas como en alimentación (Tabla 5). Además, los animales transgénicos aP2-GK no mostraron cambios en los niveles séricos de leptina y adiponectina respecto a los niveles de los animales controles alimentados. Estos resultados sugerían que la expresión de la glucoquinasa en el tejido adiposo blanco no alteraba su secreción de estas adipoquinas. Ello estaría de acuerdo con el hecho de que los ratones transgénicos no desarrollaron obesidad.

		Insulina (ng/ml)	Adiponectina (µg/ml)	Leptina (ng/ml)
Alimentados	Con	0.73 ± 0.04	5.24 ± 0.43	4.6 ± 1.17
	Tg	0.74 ± 0.14	5.81 ± 0.65	5.3 ± 1.76
Ayunados	Con	0.24 ± 0.04	n.d.	n.d.
	Tg	0.15 ± 0.05	n.d.	n.d.

Tabla 5. Determinación de los niveles circulantes de hormonas. Se determinó la insulina y las adipoquinas leptina y adiponectina, en animales controles (Con) y transgénicos (Tg), tal y como se describe en los Materiales y Métodos. Los resultados representan la media ±SE de al menos ocho animales por grupo.

2.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE ANIMALES TRANSGÉNICOS.

Con el fin de determinar los posibles mecanismos moleculares que pudieran estar alterados por la expresión de glucoquinasa en tejido adiposo blanco, se realizaron análisis de la expresión génica en este tejido mediante *real-time* PCR semicuantitativa. Para ello, se cuantificaron los niveles de expresión de diferentes genes involucrados en tres rutas metabólicas importantes para el tejido adiposo: el metabolismo de la glucosa, el metabolismo lipídico y el metabolismo mitocondrial.

2.4.1. Cambios en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa.

Se determinaron los niveles de expresión de diferentes enzimas que regulan la metabolización de la glucosa a través de la glucólisis. El transportador GLUT4 es determinante en la captación de glucosa tanto por el tejido adiposo como por el músculo esquelético. No se observaron diferencias en la expresión del gen *Slc2a4* (GLUT4) entre el tejido adiposo blanco de animales transgénicos y controles (Figura 42). Aunque los animales transgénicos expresaban otra hexoquinasa en tejido adiposo (glucoquinasa), no se alteró la expresión de la hexoquinasa 2 inducible por la insulina (gen *Hk2*) (Figura 42). La enzima fosfofructoquinasa (PFK) es una de las importantes reguladoras de la glucólisis. Tampoco se observaron diferencias en los niveles de expresión del gen *Pfkfb3* entre el tejido adiposo de ambos animales (Figura 42). Uno de los principales metabolitos intermediarios de la glucólisis es el piruvato, el cual puede proseguir su metabolización a través del ciclo de Krebs o a través de la glucólisis anaeróbica, según la disponibilidad de oxígeno entre otras situaciones. La síntesis de piruvato y su entrada al ciclo de Krebs en forma de acetil-CoA están reguladas por dos enzimas glucolíticas, la piruvato quinasa (PK) y la piruvato deshidrogenasa (PDH),

respectivamente. Los niveles de expresión de los genes *Pklr*, gen que codifica la isoforma hepática y eritrocitaria de la PK, y el gen *Pdha1*, gen codificante de la subunidad α de la PDH, eran similares en ambos genotipos (Figura 42). Ello estaba de acuerdo con el hecho de que la glucosa se metabolizaba hasta lactato en estos animales transgénicos. La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es la principal reguladora de la vía glucolítica anaeróbica, siendo la responsable de la formación de lactato a partir del piruvato (Figura 42). El tejido adiposo blanco de los animales transgénicos mostraba un ligero incremento en la expresión del gen *Ldh1*, codificante de la cadena A de la LDH (Figura 42). Estos resultados sugerían que el metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos parecía dirigir la glucosa hacia la producción de lactato, confirmando los resultados anteriormente observados tanto *in vitro* como *in vivo*.

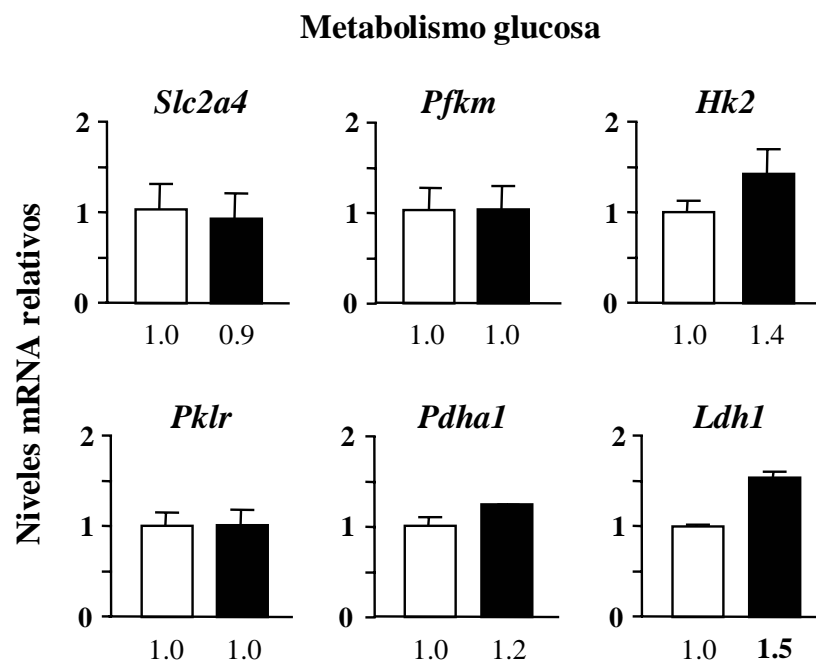


Figura 42. Análisis de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo blanco. A partir del cDNA del tejido adiposo blanco epididimal de animales controles (Con) y transgénicos (Tg) alimentados, se cuantificó la expresión génica mediante *real-time* PCR semicuantitativa utilizando la tecnología SmartCycler®. Los cálculos se realizaron tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos a los niveles de expresión génica de los controles. Los resultados representan la media \pm SE de tres animales por grupo.

2.4.2. Cambios en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos.

Para ello, se determinaron los niveles de expresión de diferentes enzimas claves en la síntesis de ácidos grasos, como la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS). Los niveles de expresión de los genes *Acaca* (ACC) y *Fasn* (FAS) se duplicaron en el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos respecto a los controles (Figura 43). Los factores de transcripción PPAR γ y SREBP-1c regulan positivamente tanto la diferenciación del adipocito como su acúmulo de grasa, a través del incremento en la expresión de las enzimas lipogénicas ACC y FAS. En el tejido adiposo blanco de los ratones transgénicos se observó un incremento en la expresión de los genes *Pparg* (PPAR γ) y *Srebf1* (SREBP-1c) (Figura 43). Además, este incremento en la expresión de PPAR γ y SREBP-1c era similar al detectado en las enzimas ACC y FAS, aunque tan sólo era estadísticamente significativo en la expresión del gen *Srebf1* (Figura 43). Para la síntesis de lípidos, el adipocito necesita captar e internalizar ácidos grasos libres para posteriormente esterificarlos a triglicéridos. Una de las proteínas de membrana que actúa como transportador de ácidos grasos hacia el interior del adipocito es la codificada por el gen *Cd36*. Aunque el gen *Cd36* también es un gen diana para el factor de transcripción PPAR γ , se observó una disminución significativa del 30% en su nivel de expresión en el tejido adiposo blanco de los ratones transgénicos (Figura 43). La degradación de los lípidos almacenados en el interior de los adipocitos está regulada por la actividad de las lipasas, especialmente la lipasa sensible a hormonas (HSL). La expresión del gen *Lipe* (HSL) en el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos parecía estar incrementada (Figura 43).

Estos resultados sugerían un incremento en la síntesis de ácidos grasos y en la adipogénesis en el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos. Sin embargo, los ratones transgénicos no mostraban un incremento en el acúmulo de grasa ni un incremento en la síntesis de ácidos grasos a partir de la glucosa. Ello podría sugerir la existencia de mecanismos compensatorios en el tejido adiposo blanco de los ratones transgénicos. Tanto la

reducción significativa en la expresión del transportador de ácidos grasos CD36 como la tendencia a incrementar la lipólisis podrían formar parte de este mecanismo compensatorio.

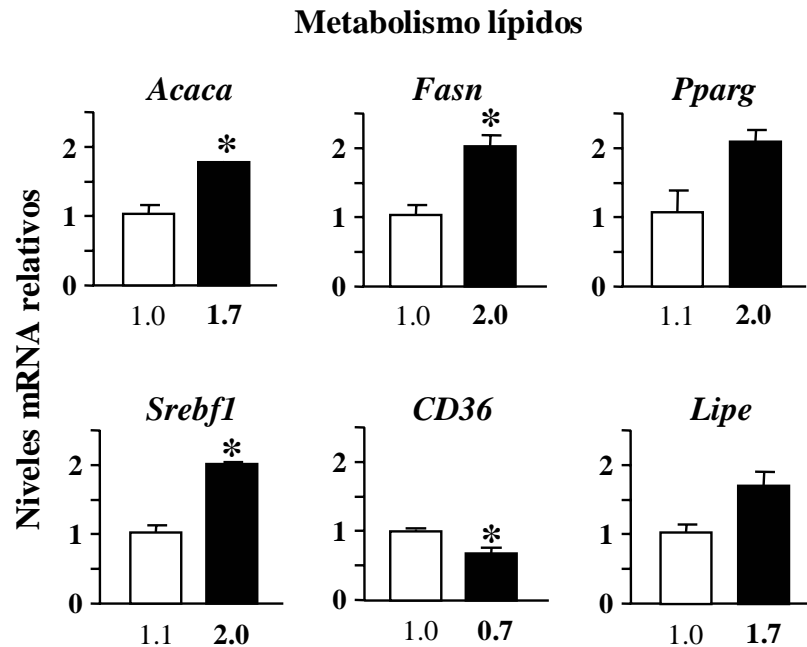


Figura 43. Análisis de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo blanco. A partir del cDNA del tejido adiposo blanco epididimal de animales controles (Con) y transgénicos (Tg) alimentados, se cuantificó la expresión génica mediante *real-time* PCR semicuantitativa utilizando la tecnología SmartCycler®. Los cálculos se realizaron tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos a los niveles de expresión génica de los controles. Los resultados representan la media \pm SE de tres animales por grupo. * $P < 0.05$.

2.4.3. Cambios en la expresión de genes involucrados en el metabolismo mitocondrial.

Para profundizar en el estudio de la producción y consumo energético de las mitocondrias del tejido adiposo blanco de los animales transgénicos, se determinaron los niveles de expresión de genes involucrados en estos procesos mitocondriales. La expresión de proteínas involucradas en la β -oxidación de los lípidos en el interior de las mitocondrias está regulada por el factor de transcripción PPAR α . Entre éstas, el transportador de la membrana interna mitocondrial CPT1 es el encargado de regular la entrada de lípidos al interior de la

matriz mitocondrial. No se observaron cambios ni en los niveles de expresión del gen *Ppara* (PPAR α) ni en los del gen *Cpt1a*, que codifica la isoforma hepática de la CPT1, en el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos (Figura 44). Las proteínas que conforman la cadena de la fosforilación oxidativa, como la proteína COX IV, son responsables de regular la producción de ATP, mientras que las proteínas desacopladoras, como UCP2 y UCP3, regulan la eficacia de esta producción en el tejido adiposo blanco. En el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos se observó un incremento significativo, de aproximadamente dos veces, en la expresión del gen *Cox4i2* (COX IV) (Figura 44). También se observó un incremento en la expresión del gen *Ucp2* en los animales transgénicos (Figura 44). Sin embargo, los niveles de expresión del gen *Ucp3* eran similares en ambos grupos (Figura 44). El coactivador de los PPARs, PGC-1 α , además de modular la actividad de éstos, está involucrado en la transcripción de genes importantes para la biogénesis y la funcionalidad mitocondrial. Los animales transgénicos mostraban niveles similares de expresión del gen *Ppargc1a* (PGC-1 α) respecto a los controles (Figura 44).

Estos resultados sugerían un incremento en la cadena respiratoria en el tejido adiposo blanco de los animales transgénicos, junto con una disminución en su eficacia. Además, estas alteraciones no eran debidas a cambios en la expresión génica de los factores de transcripción involucrados en la funcionalidad mitocondrial ni en un incremento en la β -oxidación de ácidos grasos. Por tanto, el incremento en la metabolización anaeróbica de la glucosa podría ser la responsable de las alteraciones en la funcionalidad mitocondrial, probablemente al reducir la utilización aeróbica del piruvato procedente de la glucólisis.

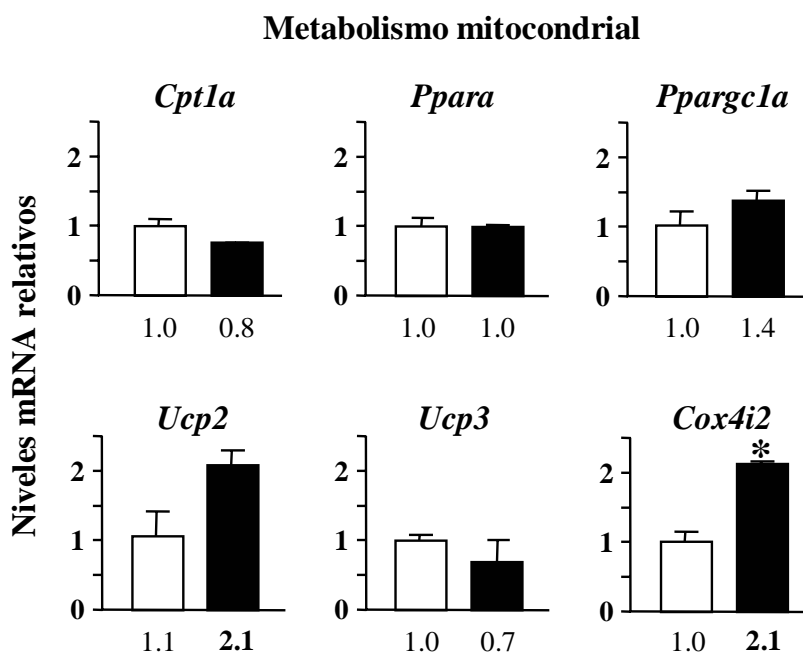


Figura 44. Análisis de la expresión de genes involucrados en el metabolismo mitocondrial en el tejido adiposo blanco. A partir del cDNA del tejido adiposo blanco epididimal de animales controles (Con) y transgénicos (Tg) alimentados, se cuantificó la expresión génica mediante *real-time* PCR semicuantitativa utilizando la tecnología SmartCycler®. Los cálculos se realizaron tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos a los niveles de expresión génica de los controles. Los resultados representan la media \pm SE de tres animales por grupo. * $P < 0.05$.

2.5. ESTUDIO DEL METABOLISMO HEPÁTICO EN LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS α P2-GK.

Dado el incremento en los niveles circulantes de lactato observado en los animales transgénicos alimentados, se determinaron varios metabolitos hepáticos tanto en alimentación como en ayunas (Tabla 6). No se observó ningún cambio en la cantidad de glucógeno ni en la concentración de lactato en el hígado de los ratones transgénicos alimentados respecto a los controles (Tabla 6). Los animales transgénicos también presentaban niveles hepáticos de glucosa-6-fosfato similares a los de un animal control alimentado (Tabla 6). Sin embargo, los ratones transgénicos alimentados mostraban un incremento del 40% en la cantidad de triglicéridos hepáticos respecto a los controles, aunque inferiores a los niveles de un animal ayunado (Tabla 6). En ayunas tampoco se observaron cambios en el depósito de triglicéridos

ni ninguna alteración en los niveles hepáticos de glucosa-6-fosfato y lactato entre animales transgénicos y controles (Tabla 6). No obstante, los animales transgénicos ayunados presentaban un incremento significativo en el acúmulo de glucógeno hepático, aunque sus niveles seguían siendo comparativamente muy inferiores a los de animales alimentados (Tabla 6).

		Glucógeno (mg glucosa/g)	Glucosa-6P (μmol/g)	Lactato (μmol/g)	TG (mg/g)
Alimentados	Con	24.61 \pm 4.55	1.30 \pm 0.20	1.13 \pm 0.24	4.5 \pm 0.7
	Tg	20.27 \pm 2.16	1.13 \pm 0.14	1.06 \pm 0.07	6.3 \pm 0.4*
Ayunados	Con	0.22 \pm 0.12	0.30 \pm 0.08	1.37 \pm 0.37	24.1 \pm 4.1
	Tg	0.81 \pm 0.13**	0.20 \pm 0.04	1.86 \pm 0.30	19.0 \pm 2.5

Tabla 6. Metabolismo hepático en animales controles (Con) y transgénicos (Tg). Los diferentes parámetros hepáticos se determinaron tal y como se indica en los Materiales y Métodos. Todos los resultados se expresan como cantidad por gramo de hígado. Los resultados representan la media \pm SE de al menos cinco animales por grupo. TG: Triglicéridos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Los resultados indicaban que la expresión de GK en tejido adiposo incrementaba su utilización basal de glucosa, mejorando la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en los animales transgénicos. Sin embargo, este incremento en la utilización de glucosa no llevaba a un aumento en la producción de glicerol-3-fosfato ni a un mayor depósito de grasa. En cambio, el tejido adiposo blanco de los ratones transgénicos mostraba un incremento en la producción de lactato, lo cual incrementaba sus niveles circulantes. El aumento del lactato circulante durante la alimentación probablemente era captado por el hígado y utilizado en la síntesis de triglicéridos, aunque no desarrollaban esteatosis hepática.

V. DISCUSIÓN.

La primera parte de este estudio demuestra que la sobreexpresión constitutiva de PEPCK en tejido adiposo incrementa la gliceroneogénesis, la reesterificación de ácidos grasos libres y el depósito de lípidos en tejido adiposo blanco y marrón. Estos resultados concuerdan con trabajos previos que sugieren que PEPCK es clave en la obtención de glicerol-3-P por el adipocito durante el ayuno, la cual permite mantener la síntesis de triglicéridos a través de la reesterificación de ácidos grasos libres (Hanson and Reshef, 1997; Reshef et al., 1970). De hecho, la ausencia de PEPCK específicamente en tejido adiposo a través de mutaciones de su promotor, en la región responsable de la expresión específica de tejido, lleva a lipodistrofia y resistencia a la insulina en ratones (Devine et al., 1999; Olswang et al., 2002). Es más, se han descrito mutaciones puntuales en esta región asociadas a la severidad de la hiperglucemia en humanos obesos y diabéticos de tipo 2 (Duplus et al., 2003). Sin embargo, aún se desconoce el papel de un incremento en la actividad PEPCK en tejido adiposo en la obesidad humana.

En el estudio de la obesidad, se han generado numerosos modelos murinos obesos que presentan alteraciones primarias a nivel del tejido adiposo. Al igual que los animales aP2-PEPCK, la sobreexpresión de GLUT4 en adipocitos de ratones transgénicos provoca un incremento de glicérido-glicerol y de la síntesis de triglicéridos (Shepherd et al., 1993b; Tozzo et al., 1995). Estos ratones también son obesos debido a una mayor captación de glucosa por el tejido adiposo asociada a la sobreexpresión de GLUT4, aunque sus adipocitos presentan hiperplasia y no hipertrofia (Shepherd et al., 1993b). Esta ausencia de hipertrofia podría ser debida a la compensación entre el aumento en la lipogénesis y el incremento en la lipólisis, favorecida por los menores niveles de insulina sanguínea (Tontonoz et al., 1995). Sin embargo, el incremento en el depósito de grasa en los animales transgénicos aP2-PEPCK está asociado a hipertrofia de los adipocitos blancos. De acuerdo con estos resultados, la activación del PPAR γ en tejido adiposo a través de las tiazolidinedionas aumenta la transcripción de los genes GLUT4 y PEPCK e incrementa el acúmulo de grasa, tanto por hipertrofia como hiperplasia del adipocito (Desvergne and Wahli, 1999; Tontonoz et al., 1995; Wu et al., 1998).

No obstante, la mayor parte de las formas de obesidad se caracterizan por hipertrofia de los adipocitos, aunque formas más severas también muestran hiperplasia de células adiposas (Hirsch and Batchelor, 1976).

Otros modelos murinos de obesidad hipertrófica, como los ratones *ob/ob* (Chen and Garg, 1999), los ratones "*yellow agouti*" (Yen et al., 1994) o los ratones deficientes para el receptor de la serotonina (Nonogaki et al., 1998), son el resultado de alteraciones en la ingestión de energía o en el gasto energético. Además de ser obesos, estos animales presentan resistencia a la insulina. En cambio, los ratones transgénicos obesos aP2-PEPCK no presentan resistencia a la insulina y muestran una ingesta y unos niveles circulantes de leptina similares a los animales controles. La obesidad está generalmente asociada a la resistencia a la insulina, favoreciendo el desarrollo de diabetes de tipo 2. Se han propuesto varios mecanismos que pueden relacionar el incremento de la masa adiposa con la resistencia a la insulina (Kahn and Flier, 2000). En humanos, existe una correlación positiva entre la cantidad de grasa visceral y el grado de resistencia a la insulina (Jensen, 1997a). Así, el incremento en la lipólisis de este depósito de grasa, y el resultante aumento en los FFAs circulantes característico de la obesidad, pueden ser los responsables del desarrollo de la resistencia a la insulina (Jensen, 1997b). De hecho, se ha descrito que el nivel excesivo de ácidos grasos circulantes induce efectos tóxicos en diferentes tejidos (Unger, 1995). Éstos incluyen la reducción en la captación de insulina por el hígado (Hennes et al., 1990), hipersecreción de insulina por las células β (McGarry and Dobbins, 1999), aumento de la gluconeogénesis hepática e inhibición de la captación de glucosa estimulada por insulina en músculo esquelético (Boden et al., 1994; Saloranta et al., 1991). Todo ello contribuye a la hiperinsulinemia e hiperglucemia características de la resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2. Los ratones aP2-PEPCK son obesos pero normoglucémicos, normoinsulinémicos y no muestran alteraciones en la tolerancia a la glucosa ni en la sensibilidad a la insulina. Además, la captación de glucosa por parte del músculo esquelético, tanto basal como estimulada por insulina, están inalteradas indicando que este tejido sigue siendo sensible a la insulina. Ello

probablemente es debido a que la sobreexpresión de PEPCK disminuye los niveles circulantes de FFAs al incrementar su reesterificación por el tejido adiposo. De hecho, se ha propuesto que la reesterificación de ácidos grasos libres puede actuar como un mecanismo de *feedback* negativo que regula la salida de FFAs del tejido adiposo, especialmente en condiciones lipolíticas (Forest et al., 2003; Reshef et al., 2003). Así, la sobreexpresión de PEPCK en tejido adiposo proporciona un buen modelo animal para estudiar el papel de la reesterificación de ácidos grasos en la obesidad. Además, este modelo sugiere que la ausencia de un incremento en los niveles sanguíneos de FFAs durante la obesidad puede proteger de la resistencia a la insulina. En este sentido, los ratones deficientes en TNF- α (TNF- $\alpha^{-/-}$) desarrollan obesidad tras una dieta alta en lípidos, pero no sólo no presentan hiperinsulinemia sino que son más sensibles a la insulina que los animales obesos controles (Uysal et al., 1997). Los menores niveles de FFAs circulantes que presentan los animales TNF- $\alpha^{-/-}$ pueden explicar la ausencia de resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en lípidos (Uysal et al., 1997). Pero no sólo los casos de obesidad se relacionan con niveles elevados de lípidos circulantes y resistencia a la insulina, ya que también se observan en las deficiencias de tejido adiposo o lipodistrofias (Seip and Trygstad, 1996). Los ratones lipodistróficos A-ZIP/F-1 desarrollan una resistencia a la insulina severa y un incremento en los niveles circulantes de FFAs y un mayor depósito de lípidos en hígado (Moitra et al., 1998). El trasplante de grasa a este modelo restablece la sensibilidad a la insulina, probablemente al recuperar tanto la capacidad del tejido adiposo de almacenar lípidos como su secreción de adipoquinas (Gavrilova et al., 2000).

La secreción de adipoquinas por el adipocito influye tanto en el metabolismo glucídico y lipídico como en la sensibilidad a la insulina, relacionando también obesidad con diabetes de tipo 2 (Dandona et al., 2004; Fasshauer and Paschke, 2003). Así, la sensibilidad a la insulina en ratas y ratones controles puede ser mejorada por un tratamiento con leptina (Fruhbeck and Salvador, 2000). Además de regular la ingesta, la leptina actúa como una hormona que previene el depósito de lípidos en células no adiposas, incrementando la oxidación de ácidos grasos y disminuyendo la lipogénesis (Unger, 2003). La leptina también ha sido descrita como

un sensor para el almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo (Fruhbeck and Salvador, 2000). Así, los modelos murinos de obesidad generalmente presentan hiperleptinemia (Fruhbeck and Salvador, 2000), aunque el desarrollo de resistencia a la acción de la hormona puede impedir sus efectos protectores frente a la lipotoxicidad (Unger, 2003). La ausencia de hiperleptinemia en los animales obesos aP2-PEPCK concuerda con los resultados que demuestran una estimulación de la secreción de leptina por un incremento de FFAs circulantes (Fabris et al., 2001). TNF- α es una adipoquina que interfiere la señalización de la insulina, pudiendo jugar un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina en la obesidad (Sethi and Hotamisligil, 1999). Sin embargo, los animales transgénicos obesos aP2-PEPCK no muestran un incremento en los niveles de TNF- α , al igual que otros estudios (Bluher et al., 2001; Koistinen et al., 2000). Además, estos ratones transgénicos aP2-PEPCK presentan un aumento en los niveles séricos de adiponectina, adipoquina con acción sensibilizadora a la insulina (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001), lo cual puede contribuir al mantenimiento de la sensibilidad a la hormona. Ello también refuerza la idea de que la disminución de la adiponectina está más íntimamente ligada a la resistencia a la insulina que a la obesidad (Abbasi et al., 2004). Los resultados de los ratones transgénicos aP2-PEPCK sugieren que una alteración primaria en el depósito de grasa no acompañada de elevados niveles circulantes de FFAs ni alteraciones en leptina y TNF- α séricas, junto con un aumento de la adiponectina, no induce resistencia a la insulina.

Dado que el incremento en la reesterificación de ácidos grasos por el tejido adiposo induce obesidad pero protege del desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes, los animales transgénicos obesos aP2-PEPCK se alimentaron con una dieta diabetogénica. Ratones controles alimentados con una dieta alta en lípidos muestran hiperlipidemia y un mayor depósito de grasa tanto en tejido adiposo como otros tejidos, desarrollando obesidad y diabetes de tipo 2 (Surwit et al., 1988). Asimismo, los ratones transgénicos aP2-PEPCK presentaron obesidad mórbida y una mayor hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa respecto a los controles en dieta alta en lípidos. Sin embargo, esta

mayor susceptibilidad a desarrollar obesidad y resistencia a la insulina inducida por la dieta no es debido a niveles circulantes de FFAs y adipoquinas, como TNF- α e IL-6, superiores a los que presentan los controles en dieta. Esta mayor susceptibilidad en los transgénicos puede ser debida al mayor depósito de grasa en tejidos no adiposos, ya que ello está correlacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina (Raz et al., 2005). La acumulación de lípidos en el hígado inhibe su metabolismo de la glucosa y disminuye su eliminación de la insulina circulante, contribuyendo así a la hiperglucemia e hiperinsulinemia (Browning and Horton, 2004; Goto et al., 1995). Es más, la esteatosis hepática o enfermedad del hígado graso no alcohólica en humanos también está asociada a resistencia a la insulina a nivel hepático, hiperinsulinemia en ayunas e hipertrigliceridemia (Seppala-Lindroos et al., 2002). Por tanto, la ausencia del depósito de grasa en tejidos no adiposos en los ratones transgénicos obesos aP2-PEPCK alimentados con dieta estándar probablemente también contribuye a mantener su sensibilidad a la insulina. Sin embargo, los transgénicos en dieta diabetogénica no sólo acumulan más grasa en el tejido adiposo blanco, sino que muestran una severa esteatosis hepática y del tejido adiposo marrón, asociadas a una hipertrigliceridemia. Se conocen otros modelos animales que presentan esteatosis hepática, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina, como los ratones que sobreexpresan glucoquinasa en hígado a largo plazo (Ferre et al., 2003). Es más, también se observan en las lipodistrofias (Moitra et al., 1998; Seip and Trygstad, 1996), las cuales pueden ser revertidas mediante el trasplante de tejido adiposo (Gavrilova et al., 2000). Se ha descrito que el tratamiento con adiponectina disminuye el contenido de lípidos en el hígado de ratones obesos (Yamauchi et al., 2001). Aunque los niveles de adiponectina circulante generalmente disminuyen en la obesidad (Hotta et al., 2000), nuestros resultados muestran que la corta exposición a una dieta diabetogénica en ratones controles induce un incremento de la adiponectina. Ello ya ha sido descrito previamente en ratas y considerado un mecanismo compensatorio a la obesidad y a la resistencia a la insulina inducida por este tipo de dieta (Li et al., 2002; Lopez et al., 2004). A diferencia de los animales controles, esta respuesta compensatoria está prácticamente

ausente en los transgénicos sometidos a la dieta alta en lípidos. Probablemente, ello no sólo contribuye a su severa resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, sino también a su gran esteatosis hepática.

Otro de los mecanismos compensatorios descritos en la obesidad y resistencia a la insulina inducidas por este tipo de dietas diabetogénicas es la termogénesis inducida por la dieta. Ésta consiste en un incremento y activación del tejido adiposo marrón por aumento de UCP1 (Cannon and Nedergaard, 2004; Lowell and Bachman, 2003). No obstante, los ratones transgénicos aP2-PEPCK sometidos a esta dieta alta en lípidos muestran una reducción tanto en la expresión como en la proteína UCP1, indicando un posible déficit en esta termogénesis compensatoria. En este sentido, los ratones genosuprimidos en todos los subtipos de receptores β -adrenérgicos (β_1 , β_2 y β_3) también muestran una disminución de UCP-1 (Bachman et al., 2002). Estos ratones presentan una disminución de la termogénesis y del gasto energético, aumentando su susceptibilidad a la obesidad y a la resistencia a la insulina inducida por dietas diabetogénicas (Bachman et al., 2002). La expresión de UCP-1 está regulada por PPAR γ y PGC-1 α (Puigserver et al., 1998; Sears et al., 1996). Coincidiendo con ello, los transgénicos aP2-PEPCK en dieta alta en lípidos presentan una reducción en la expresión de PGC-1 α y PPAR γ , incluso una disminución en los niveles proteicos de PGC-1 α . Además de una disminución en UCP-1, los ratones transgénicos aP2-PEPCK en dieta alta en lípidos muestran un mayor depósito de grasa en el tejido adiposo marrón. De la misma forma, se ha relacionado una reducción de UCP-1 con el aumento en el tamaño de las vacuolas lipídicas observado tras la activación crónica de PPAR γ mediante el tratamiento con tiazolidinedionas (TZDs) (Kelly et al., 1998). Todo ello sugiere que el déficit de la termogénesis inducida por la dieta observado en los ratones transgénicos aP2-PEPCK, probablemente debido al acúmulo excesivo de grasa en tejido adiposo marrón, contribuye a su severa obesidad y resistencia a la insulina.

En el tratamiento de la diabetes, actualmente se está utilizando las TZDs, ya que mejoran la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina, tanto en pacientes como en

modelos animales (Hauner, 2002; Olefsky, 2000; Saltiel and Olefsky, 1996). Además, las TZDs inducen una redistribución del tejido adiposo, desde la región visceral a la subcutánea, lo cual ayuda a mejorar la sensibilidad a la insulina (Akazawa et al., 2000; Kawai et al., 1999; Kelly et al., 1999; Mori et al., 1999). Las TZDs son agonistas de PPAR γ , factor transcripcional que regula diferentes genes, entre ellos el gen de la PEPCK (Devine et al., 1999; Glorian et al., 2001; Tontonoz et al., 1995). Además de los efectos ya descritos, estos fármacos reducen los niveles circulantes de FFAs e inducen ganancia de peso, probablemente al incrementar la reesterificación de FFAs a través de la activación de PEPCK, principalmente, y de la glicerol quinasa (Guan et al., 2002; Tordjman et al., 2003). Ello concuerda con los resultados obtenidos en el ratón transgénico aP2-PEPCK, indicando que la PEPCK está involucrada en el almacenamiento de triglicéridos en tejido adiposo donde ejerce un papel crucial en la regulación del depósito de grasa. Sin embargo, el fenotipo mostrado por los ratones aP2-PEPCK sometidos a dieta alta en lípidos alerta de los posibles efectos nocivos del tratamiento crónico con las TZDs si se satura la capacidad del tejido adiposo de almacenar lípidos (Figura 26). Ello sugiere la existencia de un umbral en el crecimiento de la masa grasa, crucial para el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina al actuar como probable regulador de la aparición del depósito de lípidos en tejidos no adiposos (Heilbronn et al., 2004).

La segunda parte de este estudio muestra que la expresión de GK específicamente en tejido adiposo de ratones transgénicos lleva a un incremento en la utilización de glucosa, aumentando su sensibilidad a la insulina y su tolerancia al azúcar, sin incrementar el depósito de grasa. En este sentido, los ratones transgénicos que sobreexpresan GLUT4 en tejido adiposo muestran una mayor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina debido a un aumento en el captación del azúcar, tanto en condiciones basales como estimuladas por insulina (Shepherd et al., 1993b). Sin embargo, esta mayor sensibilidad a la insulina ocurre a pesar de que estos ratones son obesos y presentan niveles circulantes de FFAs elevados y niveles séricos de adiponectina bajos (Shepherd et al., 1993a). El aumento en el número de

adipocitos de pequeño tamaño, más sensibles a la insulina, responsable de la obesidad de estos animales, podría contribuir al incremento en la sensibilidad a la hormona (Shepherd et al., 1993b;Tozzo et al., 1995). A diferencia de los ratones que sobreexpresan GLUT4, los animales que expresan GK en tejido adiposo no son obesos y no presentan ni alteraciones en el número ni en el tamaño de los adipocitos. Además, tampoco se observaron cambios en los niveles circulantes de hormonas involucradas en la homeostasis de la glucosa, como la insulina, adiponectina o leptina. Las discrepancias entre ambos modelos murinos transgénicos en respuesta al incremento en la captación de glucosa podrían ser debidas a diferencias en la magnitud de este aumento y/o a variaciones en parámetros que podrían afectar al fenotipo mostrado, como el fondo genético, la dieta,... Más aún, un mayor flujo glucolítico provocado a distinto nivel podría haber llevado a la acumulación de metabolitos de la glucosa diferentes, induciendo distintas respuestas en la señalización del azúcar. Ello estaría de acuerdo con los resultados de la sobreexpresión de la enzima limitante de la biosíntesis de hexosaminas, la glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa específicamente en adipocitos (Hazel et al., 2004). A pesar de la mayor captación de glucosa que presentan sus adipocitos, estos animales son obesos hipertróficos y muestran intolerancia al azúcar y resistencia a la insulina a nivel muscular, probablemente debido al aumento de leptina y disminución de adiponectina circulantes (Hazel et al., 2004;McClain et al., 2005).

Uno de los efectos del incremento en la captación de glucosa en el adipocito en los ratones que sobreexpresan GLUT4 es el aumento en la síntesis *de novo* de ácidos grasos, aunque ello tan sólo representa un pequeño porcentaje del azúcar captado (Shepherd et al., 1993b). Ello probablemente es debido a que una mayor utilización de la glucosa puede regular enzimas lipogénicas y glucolíticas, tanto en hígado como en tejido adiposo, a través de la glucosa-6-P (Girard et al., 1997;Towle et al., 1997). De acuerdo con esto, los ratones que expresan GK muestran un incremento en la expresión de enzimas lipogénicas, como FAS y ACC, probablemente debido a la inducción de la expresión de los factores de transcripción SREBP1 y PPAR γ . Sin embargo, el tejido adiposo de estos animales no presenta un aumento

en la síntesis de triglicéridos. Estos resultados coinciden con la baja proporción de glucosa convertida a ácidos grasos en los transgénicos que sobreexpresan GLUT4, reforzando la idea que el tejido adiposo juega un papel minoritario en la síntesis de ácidos grasos. Además, en los animales aP2-GK, la inhibición de la expresión de CD36 en los adipocitos de estos animales podría disminuir la captación de ácidos grasos procedentes de la dieta, compensando la inducción de la lipogénesis.

A concentraciones fisiológicas de glucosa, la producción de lactato es el destino mayoritario del azúcar captado por el tejido adiposo en los animales que sobreexpresan GLUT4 (Tozzo et al., 1995). De acuerdo con esto, los resultados de la expresión de GK en tejido adiposo demuestran que el incremento en su flujo glucolítico promueve un aumento en la expresión de la enzima lactato deshidrogenasa y en su producción de lactato. De hecho, ello coincide con el fenotipo observado en los ratones transgénicos que muestran un incremento en el flujo glucolítico por expresión GK en músculo esquelético y en aquellos que sobreexpresan la enzima a nivel hepático. La expresión de GK en músculo lleva a un aumento en los niveles circulantes de lactato, y su sobreexpresión hepática incrementa tanto sus niveles séricos como su contenido hepático (Ferre et al., 1996a; Ferre et al., 1996b; Otaegui et al., 2000). Es más, el aumento en la glucólisis por sobreexpresión hepática del proto-oncogen *c-myc* o por altos niveles circulantes del factor-2 de crecimiento similar a la insulina (IGF-II) promueven tanto la síntesis de glucógeno como de lactato (Rossetti et al., 1996; Valera et al., 1995). Este incremento en la producción de lactato por los hepatocitos que sobreexpresan GK tiene lugar únicamente a altas concentraciones de glucosa (Ferre et al., 1996b). Ello concuerda con lo observado en los ratones que expresan GK en adipocitos, donde el incremento en los niveles circulantes de lactato se produce en condiciones de alimentación y su producción de lactato *in vitro* a altas condiciones de glucosa. Esto probablemente refleja la potente activación de la actividad glucoquinasa por la glucosa (Printz et al., 1993).

El fenotipo de los animales transgénicos aP2-GK está de acuerdo con la visión del tejido adiposo como una significativa fuente de producción de lactato *in vivo* e *in vitro*

(Jansson et al., 1990; Marin et al., 1987). Esta producción de lactato está regulada por la insulina, epinefrina, concentración de glucosa, e incluso varía con la región anatómica, tamaño del adipocito y el estado nutricional (Crandall et al., 1983; Crandall et al., 1986; King and DiGirolamo, 1998). Es más, estudios de microdiálisis han reflejado una liberación neta de lactato por el tejido adiposo tras la ingesta de glucosa, sugiriendo que el aumento en los niveles circulantes de lactato en el período post-prandrial no sólo sería debido al metabolismo muscular (Hagstrom et al., 1990). El paradójico incremento de este precursor gluconeogénico podría estar relacionado con el posible papel del lactato como importante precursor de glucógeno o triglicéridos (Katz et al., 1993). De acuerdo con esto, la mayor liberación de lactato por el tejido adiposo en los ratones alimentados transgénicos aP2-GK promueve el depósito de triglicéridos en hígado. Además, esto sugiere que el ciclo de Cori, en el cual el lactato liberado por el músculo es convertido de nuevo en glucosa por el hígado, también se da entre tejido adiposo e hígado (Thacker et al., 1987). Aunque éste tendría un papel minoritario en condiciones fisiológicas, podría ser relevante en condiciones como obesidad o resistencia a la insulina (Faintrenie and Geloën, 1996; Watford and Fried, 1991). De hecho, la obesidad, diabetes y la edad son factores que incrementan la liberación de lactato por la masa grasa (DiGirolamo et al., 1992; Newby et al., 1990). El incremento en la liberación de lactato por el adipocito se ha relacionado con la diabetes tipo 2 en humanos y su infusión con la resistencia a la insulina en ratas (Sandqvist et al., 2001; Vettor et al., 1997). No obstante, en los ratones transgénicos aP2-GK, un aumento en los niveles circulantes de lactato no se asocia ni a obesidad ni a resistencia a la insulina. Ello sugiere que el incremento crónico en los niveles circulantes de lactato no es suficiente para aumentar la glucemia e inducir resistencia a la insulina. En este sentido, aunque los niveles plasmáticos de lactato se encuentran incrementados en humanos obesos, estos pacientes muestran una marcada disminución en la capacidad de generar lactato de forma aguda tras la sobrecarga oral de glucosa (Lovejoy et al., 1990; Lovejoy et al., 1992).

En condiciones post-prandiales, se ha considerado que el depósito de lípidos en tejido adiposo depende principalmente de la captación de glucosa estimulada por la insulina para generar glicerol-3-fosfato, necesario en la esterificación de ácidos grasos. De forma inesperada, a pesar de su mayor captación de glucosa por el tejido adiposo, los ratones que expresan GK no presentan un acúmulo de grasa, sugiriendo que este incremento en la utilización del azúcar no es suficiente para aumentar la síntesis de glicerol-3-fosfato y de lípidos. Existe una vía alternativa, llamada gliceroneogénesis, capaz de proporcionar glicerol-3-fosfato a partir de piruvato o lactato durante el ayuno, permitiendo la reesterificación de los ácidos grasos liberados por la lipólisis (Forest et al., 2003; Reshef et al., 2003). Estudios *in vitro* han descrito el lactato y el piruvato como precursores preferenciales en la síntesis de triglicéridos en el adipocito, por encima de la glucosa (Francendese and DiGirolamo, 1981). Ello está de acuerdo con la ausencia de una mayor producción de glicerol en los animales que expresan GK en tejido adiposo. Es más, estos resultados sugieren que la contribución de la glucosa a la síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo podría haber sido sobreestimada. En este sentido, a través de la utilización de isótopos de glucosa, se ha descrito que la incorporación de los carbonos de la glucosa a la grasa corporal es menor del 4% del azúcar administrado (Marin et al., 1987). Por tanto, futuros estudios deberían determinar la contribución relativa de la glucosa, piruvato o lactato a la síntesis de triglicéridos como precursores del glicerol durante la alimentación.

Así pues, a diferencia de los ratones que expresan GK en tejido adiposo, los animales transgénicos que sobreexpresan PEPCCK muestran un incremento en la producción de glicerol-3-fosfato a través de la inducción de la gliceroneogénesis. En estos ratones, un incremento en la gliceroneogénesis lleva a una mayor reesterificación de FFA, hipertrofia del adipocito y obesidad, como ya se ha descrito previamente. Por tanto, estas discrepancias sugieren que la PEPCCK y la gliceroneogénesis son cruciales en la regulación de la síntesis de triglicéridos en el adipocito, mientras que el lactato, y no el glicerol-3-fosfato, es el principal producto de la mayor utilización de glucosa inducida por expresión de GK en este tejido (Figura 45).

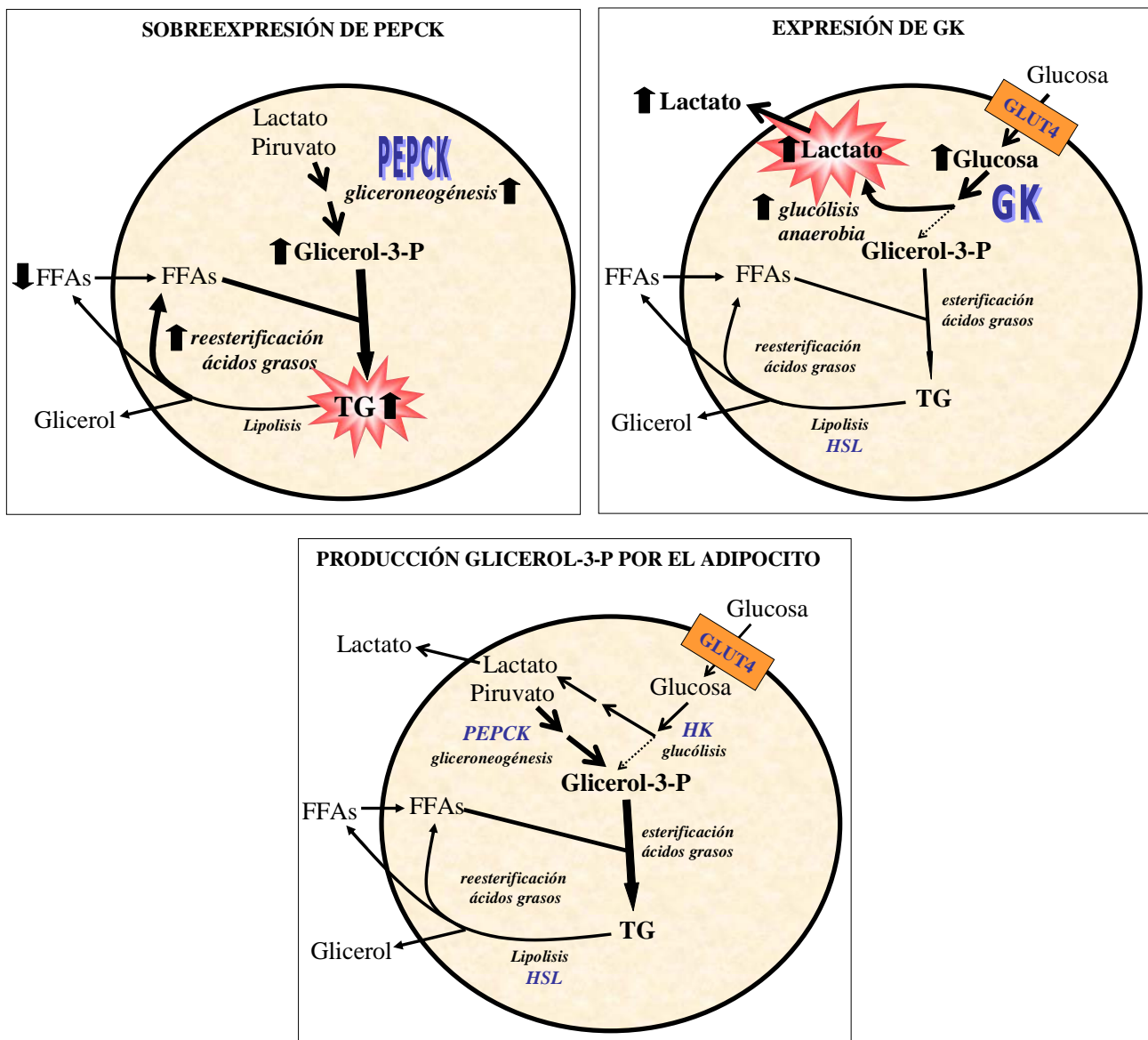


Figura 45. Producción de glicerol-3-fosfato por el tejido adiposo blanco. La sobreexpresión de la PEPCK en el adipocito lleva a un incremento en la gliceroneogénesis, la reesterificación de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos (panel superior izquierda). Sin embargo, un incremento en la utilización basal de glucosa por el tejido adiposo, a través de la expresión de la GK, no lleva a un aumento en la obtención de glicerol-3-fosfato ni en la esterificación de ácidos grasos, sino que induce una mayor producción de lactato por el adipocito (panel superior derecha). Estos resultados sugieren que la gliceroneogénesis y la PEPCK son cruciales en la obtención de glicerol-3-P por el adipocito, mientras que su síntesis a partir de la glucosa podría haber sido sobreestimada, siendo el lactato uno de los principales metabolitos producidos a partir del azúcar (panel inferior).

VI. CONCLUSIONES.

Parte I

1. La sobreexpresión constitutiva de PEPCCK en tejido adiposo lleva un aumento en la gliceroneogénesis, reesterificación de ácidos grasos y depósito de lípidos, tanto en tejido adiposo blanco como marrón.

2. Los ratones transgénicos aP2-PEPCCK en dieta estándar son obesos hipertróficos aunque sensibles a la insulina. Ello probablemente es debido a la ausencia de niveles elevados de FFAs, leptina y TNF- α circulantes, junto con la ausencia de depósito de grasa en tejido no adiposos y altos niveles de adiponectina sérica.

3. Mientras que los ratones controles alimentados con una dieta diabetogénica durante un corto período presentan obesidad y una ligera hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, los ratones transgénicos aP2-PEPCCK desarrollan obesidad mórbida, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina severas.

4. El gran depósito de lípidos en el tejido adiposo marrón de estos ratones lleva a una reducción de UCP1, y por tanto de su capacidad termogénica, lo cual contribuye a su mayor sensibilidad a la obesidad inducida por la dieta alta en lípidos.

5. Estos animales también presentan una severa esteatosis hepática asociada a la hipertrigliceridemia. Esta esteatosis puede ser responsable de la importante hiperinsulinemia, por defecto en la eliminación de la insulina circulante, y de la severa resistencia a la insulina.

6. Por tanto, los efectos combinados de la dieta alta en lípidos y el incremento en la reesterificación de ácidos grasos en tejido adiposo blanco probablemente saturan la capacidad de éste de almacenar lípidos, promoviendo el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2 al incrementar los niveles circulantes de triglicéridos y el depósito de grasa en tejidos no adiposos.

Parte II

1. La expresión constitutiva de GK en los ratones transgénicos aP2-GK lleva a un aumento en la utilización basal de glucosa y en la producción de lactato por el tejido adiposo blanco, incrementando sus niveles circulantes de lactato.

2. Sin embargo, el incremento crónico del lactato circulante no lleva a resistencia a la insulina ni a hiperglucemia, sino a una mayor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la hormona.

3. A pesar del aumento en la captación de glucosa en el tejido adiposo blanco por la presencia de la GK en estos ratones transgénicos, no se observa un incremento en la obtención de glicerol-3-fosfato ni en el depósito de triglicéridos.

4. Todos estos resultados sugieren que la PEPCK y la gliceroneogénesis son cruciales en la regulación de la síntesis de triglicéridos en el adipocito, mientras que la mayor utilización de glucosa por expresión de la GK en el tejido adiposo no es suficiente para aumentar la síntesis de glicerol-3-fosfato y la esterificación de ácidos grasos.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIALES.

1.1. ANIMALES.

Los animales utilizados en este trabajo, tanto los animales transgénicos aP2-PEPCK y aP2-GK como los controles, eran ratones híbridos de la cepa B6SJL. Todos ellos estaban alimentados *ad libitum* con una dieta estándar (Panlab, Barcelona, España) y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y luz (ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con luces a partir de las 9:00 a.m.). Cuando fue necesario, los animales se ayunaron durante 16 horas. Las muestras se obtuvieron a primera hora de la mañana (9:00-10:00 a.m.). Para el sacrificio de los animales, los ratones eran anestesiados mediante anestésicos inhalatorios (Fluothane®) y sacrificados por decapitación. Sus tejidos y órganos eran diseccionados, rápidamente congelados en nitrógeno líquido, y posteriormente se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. En los experimentos se utilizaron ratones machos de entre 3 y 6 meses de edad. Los procedimientos experimentales se aprobaron por el Comité de Ética y de Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.1.1. Obtención de los ratones transgénicos y establecimiento de sus líneas.

Para la obtención de animales transgénicos se utilizó la técnica de microinyección de DNA en el pronúcleo masculino de oocitos fecundados (Nagy A., 2002). Los oocitos fecundados de ratón utilizados en la microinyección de DNA se obtuvieron a partir de hembras donantes híbridas B6SJLF1, procedentes del cruce de animales de las cepas genéticas C57BL/6J y SJL/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Los genes quiméricos se purificaron por electroelución y se microinyectaron en estos oocitos fecundados. Los oocitos

microinyectados se implantaron en hembras receptoras de la cepa CD-1. Estos procesos se realizaron en el Servei de Biotecnologia Animal de la UAB.

Todos los animales nacidos tras la implantación de embriones se analizaron mediante Southern blot para la detección de los posibles animales transgénicos, a partir del DNA extraído de la cola. Los ratones transgénicos detectados se usaron como fundadores de las líneas transgénicas. Para ello, los ratones fundadores se cruzaron con animales híbridos B6SJLF1. Los animales transgénicos aP2-GK se mantuvieron como colonia transgénica en heterocigosis. Sin embargo, a fin de establecer una línea de animales transgénicos aP2-PEPCK homocigotos, se cruzaron entre ellos animales transgénicos aP2-PEPCK heterocigotos. Los animales transgénicos aP2-PEPCK candidatos a presentar el transgen en homocigosis se comprobaron a partir de varios cruces con controles B6SJLF1, analizando por Southern blot la totalidad de su descendencia (toda debía ser transgénica). Se utilizaron hermanos de camada como controles de los animales transgénicos en los diferentes experimentos.

1.2. CEPAS BACTERIANAS Y VECTORES PLASMÍDICOS.

La cepa bacteriana utilizada para la obtención de las diferentes construcciones plasmídicas fue la cepa DH5 α de *E. coli*. Las construcciones plasmídicas incluían el gen de la resistencia a la ampicilina para su selección. Así, el crecimiento de estas bacterias se realizaba a 37°C en medio de cultivo LB (*Miller's LB Broth*, Laboratorios CONDA, Madrid), con una concentración de 50 mg/mL de ampicilina para su selección. Glicerizados de estas bacterias se conservaron a -80°C en medio LB con glicerol al 20% (vol/vol). Los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo fueron:

-pB7.0, que contenía el gen de la PEPCK de rata (gentileza del Dr. Hanson, Case Western Reserve University, Cleveland, USA).

-pSKII+/prom.aP2, que contenía el promotor del gen *aP2* (gentileza del Dr. Spiegelman, Harvard Medical School, Boston, USA).

-pPCK2.4-rGK-SV3', que contenía el cDNA de la GK de rata, diseñado en nuestro laboratorio (Ferre et al., 1996a).

1.3. SONDAS DE DNA.

Para detectar la incorporación de los transgenes aP2-PEPCK y aP2-GK en el genoma de los animales se utilizaron las siguientes sondas de DNA:

-Para los animales transgénicos aP2-PEPCK: fragmento *SphI-SphI* de 3.85 kb que contenía parte de la secuencia del gen PEPCK.

-Para los animales transgénicos aP2-GK: fragmento *BamHI-Bgl I* de 3.5 kb que contenía las últimas 2 kb de la secuencia del promotor del gen *aP2* y las primeras 1.5 kb de la secuencia del cDNA de la GK.

Para los Northern blot, las sondas utilizadas eran:

-Sonda PEPCK: fragmento *SphI-SphI* de 1.7 kb que contenía parte de la secuencia del gen de la PEPCK, cedido por el Dr. Hanson (Case Western Reserve University, Cleveland, USA).

-Sonda GK: fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2.3 kb que contenía toda la secuencia del cDNA de la GK de rata, cedido por el Dr. Iynedjian (University of Geneva, Geneva, Switzerland).

-Sonda UCP1: sonda del cDNA de UCP1 de rata cedida por el Dr. Ricquier (Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris, France).

-Sonda PPAR γ : sonda cedida por el Dr. Spiegelman (Harvard Medical School, Boston, USA).

-Sonda PGC-1 α : fragmento *EcoRI-EcoRI* de 0.7 kb que contenía parte de la secuencia del cDNA de la PGC-1 α , cedida por el Dr. Spiegelman.

-Sonda 18S: fragmento *EcoRI-EcoRI* de 5.7 kb del cDNA humano, cedida por el Dr. Gamboa.

1.4. ANTICUERPOS.

Para la realización de los Western-blot presentes en esta tesis doctoral se utilizaron los siguientes anticuerpos:

-Anticuerpo de oveja contra la proteína GK de rata, cedido por el Dr. Magnuson (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA). Se utilizó una dilución 1:1000.

-Anticuerpo de conejo contra la proteína PEPCCK de Abgent (Abgent, San Diego, CA, USA). Se utilizó una dilución 1:500.

-Anticuerpo de conejo contra la proteína UCP1 de Abcam (Abcam, Cambridge, UK). Se utilizó una dilución 1:1000.

-Anticuerpo de conejo contra la proteína PPAR γ de Abcam (Abcam, Cambridge, UK). Se utilizó una dilución 1:2000.

-Anticuerpo de conejo contra la proteína PGC-1 α de Chemicon (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Se utilizó una dilución 1:2000.

Para la inmunodetección, se utilizaron diversos anticuerpos secundarios con marcaje no radiactivo:

-Anticuerpo secundario de cabra contra las inmunoglobulinas de oveja, biotinilado de Dako (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Se utilizó una dilución 1:2000.

-Anticuerpo secundario de cabra contra las inmunoglobulinas de conejo, conjugado con peroxidasa de Dako (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Se utilizó una dilución 1:2000.

2. MÉTODOS.

2.1. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.

2.1.1. Preparación DNA plasmídico.

Para obtener pequeñas cantidades de DNA plasmídico se purificó a partir de unos 3-5 mL de medio de cultivo bacteriano, según el protocolo de lisis alcalina descrito originalmente por *Birnboim y Doly* (Birnboim and Doly, 1979). Gracias a este método rápido, se obtienen entre 3-4 μg de plásmido por mL de medio de cultivo. Este protocolo consiste en la degradación de la pared bacteriana por la acción de la lisozima (solución de lisozima: Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM, Lisozima 5 mg/mL). Tras la acción de la lisozima, se realiza una lisis alcalina del esferoplasto (solución de lisis: NaOH 0.2 M, SDS 1%) y una precipitación selectiva del DNA genómico bacteriano y de las proteínas desnaturalizadas mediante una solución concentrada de acetato potásico a pH ácido (Acetato potásico 3 M pH 4.8, ácido acético glacial 2 M). El DNA plasmídico (sobrenadante resultante) se purifica mediante la precipitación con isopropanol y el lavado con etanol al 75%. Para degradar el RNA bacteriano, se recomienda añadir RNAsa A a la solución de lisozima (concentración final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Sin embargo, para la obtención de cantidades mayores de DNA, se realizaron purificaciones a partir de 250-500 mL de medio de cultivo. Aunque se utiliza el mismo principio de obtención (lisis alcalina), la purificación del DNA se realiza mediante columnas comerciales *QIAGEN Plasmid Maxi kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA).

2.1.2. Enzimas de restricción.

Las endonucleasas de restricción son enzimas purificadas de bacterias o de hongos, que presentan una marcada especificidad frente a secuencias cortas de DNA y actúan sobre ellas rompiendo los enlaces fosfodiésteres y por tanto, la cadena de DNA. Estas enzimas son comerciales y están resuspendidas en soluciones que contienen un 50% de glicerol. Su actividad enzimática puede ser afectada por la composición del tampón de restricción, especialmente pH y concentración de iones, la temperatura de incubación o si el DNA está metilado o no. De forma general, el DNA se digiere en una proporción de 1 unidad de enzima por μg de DNA, evitando superar el 5% de glicerol en el tampón de restricción. El tiempo de digestión oscila, entre 1-2 horas para el DNA plasmídico y toda una noche para el DNA genómico. Los productos de restricción son analizados en geles de TAE/agarosa.

2.1.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.

2.1.3.1. Geles de agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica muy útil utilizada para la separación analítica o preparativa de fragmentos de DNA de un tamaño superior a 100 pb. Tras la digestión del DNA con enzimas de restricción, la visualización de los fragmentos de DNA se consigue mediante la incorporación de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al gel de agarosa. El bromuro de etidio es capaz de intercalarse entre las cadenas de DNA y aparece como una banda de color naranja cuando se somete a iluminación ultravioleta (300 nm). Gracias al bromuro de etidio podemos detectar cantidades de DNA superiores a 5 ng. En este trabajo se han utilizado geles de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8.3, EDTA 1 mM). Para determinar el tamaño de las diferentes bandas de DNA se utilizaron diferentes marcadores de peso molecular (*Marker X* de Roche y *DNA ladder 1 kb* de Invitrogen).

2.1.3.2. Purificación de los fragmentos de DNA.

Para la purificación de los fragmentos de DNA de los geles de agarosa se utilizó el producto comercial *QIAEX II® Gel Extraction kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) siguiendo el protocolo comercial. Éste es un método rápido basado en la disolución del fragmento de agarosa, que contiene la banda deseada, en un agente caotrópico. En este caso, el agente caotrópico es una solución saturada de NaI. Estas condiciones permiten una adsorción selectiva del DNA a una matriz de sílice. Posteriormente, el DNA se lava y se eluye en condiciones de baja fuerza iónica que favorecen la separación del DNA de la matriz de sílice.

2.1.4. Construcción de moléculas híbridas de DNA.

Los fragmentos de DNA purificados, se combinaron y trataron con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 de GIBCO BRL (Invitrogen, San Diego, CA, USA) siguiendo el protocolo comercial. Gracias a la ligasa, los diferentes fragmentos son fusionados por sus extremos compatibles, ya sean cohesivos o romos. El plásmido resultante se introduce en bacterias competentes DH5 α de *E. coli* mediante el protocolo de transformación. Las bacterias que han incorporado el plásmido son seleccionadas mediante la adición del antibiótico adecuado, y posteriormente confirmando la obtención de la molécula híbrida, mediante análisis del DNA plasmídico.

2.1.4.1. Subclonaje de los fragmentos de DNA.

Las técnicas de subclonaje son ampliamente utilizadas con diferentes finalidades. Consisten en la digestión del DNA mediante las enzimas de restricción y la ligación de los fragmentos deseados con vectores plasmídicos, digeridos también con enzimas de restricción. Estas técnicas han sido utilizadas en la obtención de los dos genes quiméricos aP2-PEPCK y aP2-GK utilizados en este estudio.

2.1.4.2. Transformación de las células de *E. coli*.

Las bacterias DH5 α de *E. coli* utilizadas se hicieron competentes mediante el método de *Hanahan* (Hanahan, 1983). Este método utiliza MgCl₂ y CaCl₂ como agentes permeabilizadores de la membrana, permitiendo que las bacterias incorporen el plásmido deseado. El método de transformación utilizado consistió en la incubación de las bacterias competentes con el DNA plasmídico durante 10 minutos en hielo, inmediatamente se incubaron a 42°C durante 45 segundos y se mantuvieron nuevamente en hielo durante 5 minutos. Tras este tratamiento, se añadió medio de cultivo (200 μ L de LB) a las bacterias y se dejaron en agitación a 37°C durante 40 minutos. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 2000xg para concentrar las bacterias. Resuspendiendo el sedimento bacteriano con un volumen mínimo de medio de cultivo residual, se hicieron extensiones sobre una placa de LB con ampicilina (50 μ g/mL LB) para seleccionar aquellas bacterias transformadas con el plásmido deseado. Aquellos clones resistentes (clones positivos) se volvieron a crecer en 3-5 mL de medio LB/ampicilina para amplificarlos y analizar la presencia de la molécula híbrida deseada.

2.1.5. Marcaje radioactivo de las sondas de DNA.

Las sondas utilizadas tanto en los Southern blot como en los Northern blot se marcaron radiactivamente con [α -³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Corp., Arlington Heights, Ill.). Para el marcaje, se utilizó el kit comercial *Ready-To-Go[®] DNA labelling Beads* (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez marcadas radiactivamente, las sondas se filtraron a través de columnas de *Sephadex G-50* (Probe Quant[®] G-50 Micro Columns, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). Gracias a la gel filtración de las sondas marcadas, se separaban los nucleótidos radiactivos no incorporados a las sondas, reduciendo la radiactividad inespecífica.

2.2. DETECCIÓN DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS.

2.2.1. Obtención del DNA genómico.

La detección del transgen, tanto de los animales transgénicos aP2-PEPCK como de los transgénicos aP2-GK, se realizó mediante Southern blot. Para la obtención de DNA genómico se siguió una adaptación del método de *De Wet* (de Wet et al., 1987), en la cual se precipita el DNA del homogenado por salinidad y utilización de isopropanol. Finalmente es lavado con etanol al 75% y resuspendido en agua o TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

Fragmentos de cola de entre 0.5-1 cm de animales de tres semanas de edad se homogenizaron en una solución de lisis tamponada (SDS 0.2%, proteinasa K 10 mg/mL 1%, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM pH 8, Tris-HCl 100 mM pH 8.5) y se incubaron a 56°C toda la noche. Esta incubación permite la digestión del tejido por la proteinasa K, liberando el DNA genómico de las células. Tras la digestión, se añadieron 250 μ L de NaCl saturada, se centrifugó durante 15 minutos a 12000xg y se recuperó el sobrenadante. A partir de este sobrenadante se precipitó el DNA genómico con isopropanol y se centrifugó durante 15 minutos a 12000xg. En este punto, el DNA aparece en forma de precipitado blanquecino o *pellet*. Se descartó el sobrenadante mediante aspiración. Posteriormente, se lavó el *pellet* de DNA con etanol al 75%, se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 16000xg y se descartó nuevamente el sobrenadante por aspiración. Tras dejar evaporar los restos de etanol 5 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió el DNA en 55 μ L de agua o de TE, previamente calentada a 56°C para favorecer la resuspensión. Finalmente, el DNA así obtenido se analizó mediante Southern blot.

2.2.2. Análisis del DNA mediante Southern blot.

2.2.2.1. Digestión y electroforesis del DNA genómico.

Los animales se genotiparon en controles y transgénicos aP2-PEPCK o aP2-GK mediante Southern blot. Para ambas genotipaciones se realizó una digestión enzimática de 10 µg de DNA genómico con la enzima de restricción *EcoRI* a 37°C durante toda la noche. Tras la digestión, se añadió tampón de carga 10x (Glicerol 50%, EDTA 100 mM, SDS 1% y azul de bromofenol 0.1%) al DNA genómico digerido y se sometió a electroforesis en gel de TAE con un 1% de agarosa y 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. En las electroforesis de DNA se utilizó un marcador de peso molecular (*DNA Molecular Weight Marker X*, Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Tras la electroforesis (4-5 horas a 45-65 voltios), el gel de agarosa se trató con HCl 0.25 M durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. El tratamiento ácido se utiliza para despurinizar el DNA y asegurar que los fragmentos de elevado peso molecular sean transferidos correctamente desde el gel a la membrana. Tras el tratamiento ácido, el gel se trató con solución alcalina (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente, para desnaturalizar la doble cadena de DNA. Finalmente, el gel se trató con una solución neutralizante (Tris 1 M, NaCl 3 M) durante 30 min en agitación a temperatura ambiente, para neutralizar el pH del gel y volver a cargar negativamente el DNA.

2.2.2.2. Transferencia del DNA desde el gel a una membrana.

Tras el tratamiento del gel de agarosa, se realizó la transferencia del DNA desde el gel a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). El método de transferencia utilizado fue el sistema Turboblotter® (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). Este sistema consiste en la capilaridad por presión negativa en el tampón de alta fuerza iónica SSC 10x (NaCl 1.5M, citrato sódico 0.15 M pH 7.4) a través de papeles absorbentes GB002 y GB004 (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). Transcurrido un mínimo de dos horas de transferencia, el DNA se fijó a la membrana de nylon

mediante la irradiación de 120000 μ J de luz ultravioleta en 25-50 segundos, con el sistema UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA) con el fin de crear uniones covalentes entre el DNA y la membrana.

2.2.2.3. Prehibridación/Hibridación de la membrana.

Una vez el DNA se fijó a la membrana de nylon, ésta se prehibridó con la solución de prehibridación/hibridación (Na_2HPO_4 0.25 mM pH 7.2, SDS 20%, EDTA 1mM, Blocking reagent 0.5%) durante un mínimo de dos horas a 65°C en agitación rotacional. Esta solución bloquea la membrana que no contiene DNA fijado, gracias al detergente SDS, los fosfatos y el *blocking reagent* (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Bloqueando la membrana se reduce la hibridación inespecífica cuando se hibrida con sondas marcadas radiactivamente. Tras la prehibridación, las membranas se hibridaron con la sonda radiactiva correspondiente al Southern blot a realizar, en agitación rotacional a 65°C durante toda la noche.

2.2.2.4. Lavados de la membrana y revelado.

Tras la hibridación, las membranas se lavaron con soluciones astringentes para eliminar el exceso de sonda y la radiactividad inespecífica que pudiera unirse a la membrana mediante uniones débiles. Para ello, se realizaron tres lavados consecutivos con dos soluciones de diferente astringencia. Los dos primeros lavados se realizaron con solución de baja astringencia (NaCl 300 mM, citrato sódico 30 mM, SDS 0.1%) durante 15 minutos a 30°C en agitación rotacional. El último lavado se realizó con solución de alta astringencia (NaCl 15 mM, citrato sódico 1.5 mM, SDS 0.1%) durante 30 minutos a 65°C en agitación rotacional. Si los lavados son efectivos, tan sólo la sonda radiactiva que haya reconocido y se haya unido a su fragmento de DNA complementario permanece en la membrana, reduciendo así la radiactividad inespecífica (*background*). Finalmente, las membranas se expusieron en una película fotográfica para obtener la señal que permitiera la genotipación de los animales.

2.3. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA.

2.3.1. Extracción del RNA total.

La obtención de RNA total se realizó a partir de los diferentes tejidos congelados en nitrógeno líquido mediante el uso de la solución TriPure[®] Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) o de la solución QIAzol[®] Lysis Reagent (QIAGEN Sciences, Maryland, USA), en ambos casos siguiendo el protocolo comercial. El método se basa en la separación del RNA mediante fenol-cloroformo y la protección del RNA gracias a la solución de guanidina tiocianato, que actúa como inhibidor de ribonucleasas. Este método fue descrito por *Chomczynski and Sacchi* (Chomczynski and Sacchi, 1987). La diferencia existente entre las dos soluciones comerciales es el tipo de tejido para el que está recomendado su uso. Mientras que el TriPure[®] se puede utilizar para multitud de tejidos, para los tejidos con elevada cantidad de grasa es recomendable el QIAzol[®]. Así, se utilizó el QIAzol[®] para la extracción de RNA total del WAT y BAT y también del hígado de los animales alimentados con dieta HFD. Sin embargo, se utilizó TriPure[®] para la extracción de RNA total del hígado de los animales alimentados con dieta estándar. Tras la precipitación del RNA con isopropanol y los posteriores lavados con etanol al 75%, el RNA se resuspendió en agua con DEPC (Dietilpirocarbonato, otro inhibidor de ribonucleasas) calentada a 56°C. El volumen en el que se resuspendió el RNA dependía del tejido. Mientras que para el hígado se utilizó un volumen mayor (100-150 μL), para el WAT y el BAT se utilizaron volúmenes menores (30-40 μL) concentrando al máximo la cantidad de RNA total extraído. Finalmente se determinó la concentración de RNA de las diferentes muestras.

2.3.2. Electroforesis del RNA en geles desnaturizantes de agarosa/formaldehído.

A partir de RNA total extraído de los diferentes tejidos, se realizó la electroforesis en geles de MOPS/agarosa al 1% (MOPS/EDTA 10x, H₂O estéril, agarosa) con 2.2 M de formaldehído. Antes de la carga de las muestras de RNA en el gel de agarosa, se añadió a la cantidad de RNA un tampón de carga desnaturizante 5x (formamida desionizada, MOPS/EDTA 10x, formaldehído, H₂O estéril, glicerol y azul de bromofenol y xilencianol como colorantes). Posteriormente, las muestras de RNA se calentaron a 65°C durante 15 minutos, tras los cuales se cargaron inmediatamente en el gel de agarosa. Este tratamiento térmico permite la desnaturización de la estructura secundaria del RNA, y la presencia del formaldehído, tanto en el gel como en el tampón de carga, evita su renaturalización. Como tampón de electroforesis se utilizó una solución de MOPS/EDTA 1x (MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 1 mM pH 7). Gracias a todas estas condiciones de electroforesis, el RNA permanece desnaturizado, permitiendo la separación de los diferentes RNA mensajeros según su peso molecular. Además, para evitar la degradación enzimática del RNA por las ribonucleasas, todas las soluciones utilizadas, tanto para la formación del gel como el tampón de carga y el de electroforesis, se prepararon en condiciones libres de contaminación y se autoclavaron, excepto la solución de MOPS/EDTA 10x que se filtró.

2.3.3. Análisis del RNA mediante Northern blot (hibridación DNA-RNA).

Una vez cargado el gel de agarosa con las muestras desnaturizadas de RNA, se dejó correr la electroforesis 4-5 horas entre 30-50 voltios. A continuación se transfirió a una membrana de nylon con el sistema Turboblotter[®], de la misma manera que en el Southern blot, excepto que en este caso no se trataron con las soluciones ácida, alcalina y neutralizante. Tras la transferencia, el RNA se fijó a la membrana de nylon mediante luz

ultravioleta. Para visualizar el estado de los RNAs y descartar las membranas con RNAs degradados, las membranas se teñían con una solución colorante de azul de metileno. Para esta tinción, la membrana se trató previamente con ácido acético al 5% (2-5 minutos) y posteriormente teñida con una solución de azul de metileno (acetato sódico 150 mM, azul de metileno 0.02%, H₂O). Tras la tinción, las membranas se lavaron con agua destilada hasta visualizar las bandas 28S y 18S del RNA total. Si las muestras de RNA no estaban degradadas, las membranas se prehibridaron, hibridaron, lavaron y expusieron en una película fotográfica de igual forma que en el Southern Blot. Las bandas se cuantificaron mediante densitometría de los diferentes mRNAs y valor obtenido normalizado por la densitometría de la carga de RNA (18S).

2.4. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

2.4.1. Extracción de proteínas totales.

Las proteínas totales se obtuvieron mediante la homogenización de los fragmentos de tejidos congelados, de unos 100 mg, en 1 mL de tampón de homogenización, utilizando un homogenizador de tipo Polytron[®]. La composición del tampón de homogenización fue la siguiente: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Sacarosa 240 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, β -glicerofosfato sódico 10 mM, Tampón fosfato 5 mM, Tritón X-100 al 1%. Una vez preparado se filtró con un filtro de 0.22 μ m y se conservó a 4°C. Para la preparación del tampón fosfato (0.5 M pH 7): Na₂HPO₄ x 12H₂O 0.5 M, NaH₂PO₄ x 2H₂O 0.5 M. Se añadió el NaH₂PO₄ x 2H₂O sobre el Na₂HPO₄ x 12H₂O hasta conseguir el pH 7. Este tampón también se filtró con un filtro de 0.22 μ m y se conservó a 4°C.

Inmediatamente antes de usar el tampón de homogenización, se añadieron los inhibidores de proteasas (*Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* de Roche Diagnostics GMBH, Germany). Se utilizó una pastilla de la mezcla de inhibidores de

proteasas por cada 10 mL de tampón de homogenización. Una vez añadidos los inhibidores de proteasas, el tampón de homogenización se mantuvo siempre en hielo, al igual que el extracto resultante en los sucesivos pasos. Tras homogenizar los tejidos, el extracto se mantuvo en agitación a 4°C durante 1-2 horas, y posteriormente se centrifugó a 16000xg durante 20 minutos a 4°C. A partir del sobrenadante, se determinó la concentración de proteínas de los extractos mediante el método Bradford y se realizaron diferentes alícuotas que se guardaron congeladas hasta su utilización.

2.4.2. Determinación de la concentración de proteínas.

Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford, basado en el cambio de color del colorante azul brillante de coomassie cuando forma complejos con las proteínas. Este cambio de color produce un cambio en el máximo de absorbancia de este cromóforo (de 465 nm a 595 nm). A partir de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) a 1 mg/mL se realizó una recta patrón entre 0 y 20 µg de BSA. El volumen de la reacción era de 1 mL, de los cuales 800 µL eran agua con los estándares de la recta patrón, y 200 µL del reactivo de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad, Manchen, Germany). La misma reacción se realizó con las muestras de los diferentes extractos. En el caso de los extractos musculares y hepáticos se realizó una dilución de 1:50, mientras que no era necesario diluir los extractos del tejido adiposo. Tras añadir el reactivo de Bradford, las muestras se agitaron y se incubaron durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteína de los diferentes extractos se obtuvo a partir de la interpolación de sus absorbancias en la recta patrón calculada.

2.4.3. Análisis de las proteínas mediante Western-blot.

2.4.3.1. Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida.

El análisis de las proteínas se realizó mediante la electroforesis de las muestras proteicas en geles de poliacrilamida al 10% y en presencia de SDS (Laemmli, 1970). El gel de poliacrilamida SDS-PAGE se formó por la fusión de dos geles:

-Gel compilador o *stacking*, el cual contenía un 3.9% de poliacrilamida y se situó al inicio del gel, formando los pocillos donde se depositan las muestras (parte superior del gel).

-Gel separador o *resolving*, el cual contenía un 10% de poliacrilamida y se situó al final (parte inferior del gel).

Las muestras proteicas (-20°C) se descongelaron en hielo. La cantidad de proteínas a cargar se mezcló con ½ volumen de tampón de carga Laemmli 2x (Tampón fosfato 20 mM. Glicerol 20%, SDS 4%, 2-β-mercaptoetanol 2% y azul de bromofenol como colorante). Tras desnaturizar las proteínas a 95°C durante 5 minutos, las muestras se cargaron inmediatamente al gel SDS-PAGE. Como tampón para la electroforesis se utilizó el siguiente: Tris base 5 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% (peso/vol). La electroforesis se realizó a 45 mA mientras las muestras atravesaban el gel compilador, cambiando a 60 mA cuando salieron de él y atravesaban el gel separador. En la electroforesis se utilizaron marcadores de pesos moleculares para proteínas preteñidos (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

2.4.3.2. Electrotransferencia de proteínas a membrana e inmunodetección.

La electrotransferencia de las proteínas desde el gel a las membranas *Immobilon-P* (Millipore, Billerica, MA, USA) se realizó con un aparato *Transblot modelo 2051* de LKB/Pharmacia a 250 mA durante dos horas en tampón de electrotransferencia (Tris 25 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%). Tras la transferencia, las membranas se bloquearon con TBS-

T (Tris-HCl 25 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0.05%) con leche desnatada en polvo al 5% durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Las membranas se lavaron con TBS-T (3 lavados de 5-10 minutos) y se incubaron una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios, biotinilados o conjugados con la enzima peroxidasa, diluidos 1:2000 en solución de bloqueo. En el caso del anticuerpo secundario biotinilado, las membranas se trataron con el producto comercial *ImmunoPure[®] ABC Peroxidase Staining kit Standard* (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, USA). Finalmente las membranas se lavaron con TBS-T (3x5-10 minutos). La inmunodetección se realizó mediante el producto comercial *ECL[®] Western Blotting analysis system* (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany) siguiendo el protocolo del fabricante. La membrana tratada con el *ECL[®]* se expuso en un film fotográfico para la visualización de la señal.

2.5. TÉCNICAS *IN VIVO*.

2.5.1. Dieta alta en lípidos.

Para este experimento, se administró una dieta alta en lípidos (HFD) (TEKLAD, TD 88137, Madison, Wisconsin, USA) *ad libitum* durante seis semanas a un grupo de ratones machos controles y transgénicos aP2-PEPCK de tres meses de edad. A otro grupo de animales controles y transgénicos aP2-PEPCK se les siguió administrando la misma dieta estándar utilizada para el mantenimiento de los animales (Panlab, Barcelona, España). Dado su alto contenido lipídico, la dieta HFD es muy sensible a la oxidación y se almacena a 4°C fuera del alcance de la luz. Para evitar que la dieta HFD se oxidara, disminuyendo su palatabilidad, la dieta HFD se renovó cada 3-4 días aunque quedara parte de ella.

2.5.2. Determinación del consumo de alimento.

El consumo de alimento o ingesta, tanto de dieta estándar como de dieta alta en lípidos, se determinó en animales previamente individualizados. La cantidad de comida ingerida se obtuvo de la diferencia entre la cantidad inicialmente adicionada y la cantidad remanente, trascurrida una semana para la dieta estándar, o 3-4 días para la dieta HFD. El resultado se expresó como la ingesta de alimentos en gramos por día y animal.

2.5.3. Test de tolerancia la glucosa.

Esta prueba se utiliza para determinar si el individuo es capaz de responder correctamente a una sobrecarga de glucosa, valorando el nivel de tolerancia al azúcar. Aquellos que presentaron unos niveles circulantes de glucosa por encima de lo normal y no recuperaron sus niveles basales del azúcar durante el tiempo de duración del test se consideraron intolerantes a la glucosa. Se determinó la glucemia basal en ratones despiertos y ayunados durante una noche (aprox. 16 horas) a partir de una gota de la vena de la cola mediante el sistema Glucometer Elite[®]. Tras la inyección intraperitoneal de una dosis de 1 gramo o 2 g de glucosa por kg de peso vivo, se determinó la evolución de la glucemia a lo largo del tiempo. Los resultados se expresaron como las glucemias en mg/dL en los diferentes puntos del experimento.

2.5.4. Test de tolerancia a la insulina.

Esta prueba permite valorar la sensibilidad corporal a la insulina de un individuo, considerándose resistentes a la insulina aquellos que muestran una reducida respuesta hipoglucemiante a la hormona. Tras retirar la comida a los animales, se determinó inmediatamente la glucemia basal en ratones despiertos a partir de una gota de la vena de la

cola, mediante el sistema Glucometer Elite[®]. Posteriormente, se inyectó intraperitonealmente una dosis de 0.75 U o 0.375 U de insulina por kg de peso vivo y se determinó la evolución de la glucemia a lo largo del tiempo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de los niveles circulantes de glucosa en los diferentes puntos del experimento, respecto a los niveles basales previos a la inyección de la hormona (100%).

2.5.5. Determinación del índice de utilización de la glucosa *in vivo*.

Para la determinación del metabolismo de la glucosa *in vivo* en los tejidos, se utilizó un método derivado de la técnica de *Sokoloff* (Sokoloff et al., 1977). Este método se basa en las propiedades bioquímicas del análogo no metabolizable de la glucosa, 2-deoxi-*D*-[1-³H]-glucosa (2-DG; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) (Ferre et al., 1985). Una vez la 2-DG circulante es captada por los tejidos a través de los mismos transportadores que la glucosa, es fosforilada por las hexoquinasas presentes en el tejido, iniciándose así su entrada en las vías metabólicas. Pero la forma fosforilada de la 2-DG, 2-DG-6-fosfato, mayoritariamente no puede proseguir su metabolización y se acumula en los tejidos. Así, la determinación intratisular de 2-DG-6-fosfato es un parámetro que nos ayuda a valorar la capacidad de captación y utilización de la glucosa por los tejidos, siempre que su degradación por la glucosa-6-fosfatasa (G-6Pasa) sea negligible. La actividad G-6Pasa es alta en los tejidos gluconeogénicos (hígado y riñón) pero muy baja en el resto de tejidos (Lackner et al., 1984). Para la determinación del índice de utilización basal de la glucosa *in vivo* en el músculo esquelético y en el WAT, se inyectó intravenosamente 1 μ Ci de 2-DG a animales machos controles y transgénicos α P2-PEPCK y α P2-GK alimentados. Para la determinación del índice de utilización de la glucosa *in vivo* estimulada por insulina, se inyectó intraperitonealmente 0.75 IU de insulina/kg de peso vivo (Humulina Regular[®]; Eli Lilly, Indianapolis, IN) a los ratones a tiempo 0. Los ratones se anestesiaron y se les inyectó 2-DG a través de la vena yugular. La eliminación específica de 2-DG de la circulación se determinó según el método de

Somogyi (Somogyi M., 1945), a partir de 25 μ L de sangre extraída de la cola a los tiempos 1, 15 y 30 minutos después de la inyección. Transcurridos 30 minutos, los animales se sacrificaron, y el WAT epididimal y los músculos esqueléticos gastrocnemio y cuádriceps se extrajeron rápidamente. El índice de utilización de la glucosa se determinó como la medida de la acumulación de compuestos radiomarcados en músculo esquelético y WAT (Ferre et al., 1985). La cantidad de 2-DG-6-fosfato por miligramo de proteína del tejido se dividió por la disponibilidad de 2-DG circulante para los tejidos, calculada como la integral de la relación entre la concentración de 2-DG y la glucosa no marcada en la sangre. Como los valores no estaban corregidos por la "constante de discriminación" de la 2-DG en las vías metabólicas de la glucosa, los resultados se expresaron como el índice de utilización de la glucosa, en picomoles por miligramo de proteínas por minuto.

2.6. TÉCNICAS *IN VITRO*.

2.6.1. Determinación de la gliceroneogénesis y de la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir del piruvato.

Para la determinación de la síntesis de glicerol-3-P y la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir del piruvato, se incubó *in vitro* el tejido adiposo blanco epididimal con [2-¹⁴C]-piruvato (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). Los ratones se anestesiaron, se sacrificaron y se diseccionó el tejido adiposo blanco epididimal (WAT). Fragmentos de WAT de aproximadamente 200 mg de peso se incubaron a 37°C durante 2 horas en 3 mL de tampón Krebs-Ringer Bicarbonato HEPES (KRBH) a pH 7.4 y conteniendo 3% de BSA (libre de ácidos grasos), junto con 5 mmol/L de piruvato y 0.3 μ Ci de [2-¹⁴C]-piruvato. Tras la incubación, los lípidos se extrajeron del tejido mediante cloroformo:metanol (2:1) según el método de *Folch* (Folch et al., 1957). De los lípidos totales extraídos, se separaron los ácidos grasos libres (FFAs) y el glicerol (glicerido-glicerol) siguiendo el método

de *Hanson* (Hanson, 1965). Este método consiste en hidrolizar los lípidos extraídos mediante saponificación y separar las diferentes fracciones con éter de petróleo (40-60°C). La mayor fracción lipídica está formada por los triglicéridos, formas lipídicas saponificables. Para separar los FFAs del glicerol, este método utiliza una propiedad física de los FFAs. Tras la saponificación, los FFAs son solubles en agua en condiciones alcalinas pero insolubles en condiciones ácidas, mientras que el glicerol es soluble en condiciones ácidas. Se determinó la cantidad de ^{14}C , procedente del $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -piruvato, en las diferentes fracciones lipídicas separadas (lípidos totales, FFAs y glicerol). La cantidad de ^{14}C en la fracción de los FFAs refleja la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir del piruvato. Sin embargo, la cantidad de ^{14}C en la fracción del glicerol refleja la síntesis de glicerol a partir del piruvato (gliceroneogénesis). Los resultados se expresaron como cpm de ^{14}C divididas por la cantidad de proteínas que tenía el tejido que se incubó y el tiempo de incubación ($\text{cpm} \times \mu\text{g} \text{ proteínas}^{-1} \times \text{hora}^{-1}$). La concentración de proteínas del WAT incubado se determinó mediante el método Bradford.

2.6.2. Determinación de la producción de glicerol-3-P y de la síntesis *de novo* de lípidos a partir de la glucosa.

Para la determinación de la síntesis de glicerol-3-P y la síntesis *de novo* de lípidos a partir de la glucosa, se incubó *in vitro* el tejido adiposo blanco epididimal con D-[U- ^{14}C]-glucosa (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). Esta determinación se realizó de la misma forma que la de la gliceroneogénesis y la síntesis de ácidos grasos a partir del piruvato. La única diferencia consistió en incubar los fragmentos de WAT con 5 mmol/L de glucosa y 0.3 μCi de D-[U- ^{14}C]-glucosa, en vez de 5 mmol/L de piruvato y 0.3 μCi de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -piruvato. La extracción de lípidos y la separación del glicerol de los FFAs se realizó de la forma anteriormente descrita. Se determinó la cantidad de ^{14}C , procedente de la D-[U- ^{14}C]-glucosa, en las diferentes fracciones lipídicas separadas (lípidos totales, FFAs y glicerol). La cantidad de ^{14}C en la fracción del glicerol refleja la síntesis de glicerol-3-P a partir de la glucosa. Los

resultados se expresaron como cpm de ^{14}C divididas por la cantidad de proteínas que tenía el tejido que se incubó y el tiempo de incubación ($\text{cpm} \times \mu\text{g} \text{ proteínas}^{-1} \times \text{hora}^{-1}$). La concentración de proteínas del WAT incubado se determinó mediante el método Bradford.

2.6.3. Determinación de la reesterificación de los ácidos grasos.

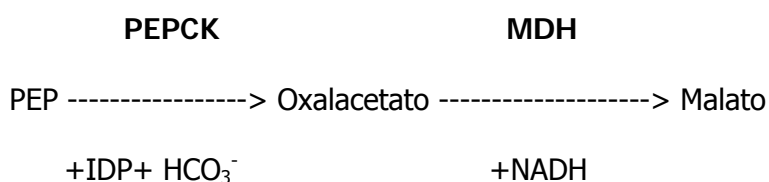
Para la determinación de la reesterificación de los ácidos grasos libres por el tejido adiposo *in vitro* se utilizó el método descrito por *Vaughan* (Vaughan, 1962). Al igual que en la determinación de la gliceroneogénesis, fragmentos de WAT epididimal se incubaron *in vitro* a 37°C durante 2 horas en 3 mL de tampón Krebs-Ringer Bicarbonato HEPES (KRBH) a pH 7.4 y conteniendo 3% de BSA (libre de ácidos grasos), junto con 5 mmol/L de piruvato. Otros fragmentos de WAT se procesaron sin la incubación previa con piruvato para la determinación del contenido de FFAs y glicerol a tiempo cero. Los lípidos se extrajeron del tejido, antes y después de la incubación con piruvato, mediante cloroformo:metanol (2:1) según el método de *Folch* (Folch et al., 1957). Posteriormente, a partir del extracto lipídico, se separaron los ácidos grasos libres (FFAs) y el glicerol siguiendo el método de *Hanson* (Hanson, 1965). Los FFAs y el glicerol se determinaron, tanto en el tejido como en el medio, antes y después de la incubación. La tasa de reesterificación de FFAs se calculó como la diferencia entre la cantidad teórica de FFAs liberados por el tejido adiposo a partir de triglicéridos (lipólisis), y la cantidad real de FFAs liberados al medio tras la incubación más la cantidad de FFAs presente en el tejido adiposo a tiempo cero. La cantidad teórica de FFAs liberados a través de la lipólisis se calculó a partir de la cantidad de glicerol producido, asumiendo que 3 moles de FFAs son producidos por cada mol de glicerol. La cantidad de glicerol producido es un fiel reflejo de la tasa lipolítica del WAT (Vaughan, 1962). La cantidad de glicerol producido se determinó como la diferencia entre la cantidad de glicerol en el tejido adiposo a tiempo cero, y la cantidad de glicerol presente en el tejido adiposo incubado más la cantidad de glicerol en el medio de incubación.

2.6.4. Consumo de glucosa y producción de lactato por el WAT epididimal.

Para la determinación del consumo de glucosa y la producción de lactato por el tejido adiposo blanco, fragmentos de WAT se incubaron a 37°C durante 2 horas en 3 mL de tampón Krebs-Ringer Bicarbonato HEPES (KRBH) a pH 7.4 y conteniendo 3% de BSA (libre de ácidos grasos), junto con dos concentraciones de glucosa diferentes: glucosa 20 mM y glucosa 2 mM (Ferre et al., 1996b). Se utilizaron dos concentraciones de glucosa, una basal (2 mM) que activa otras hexoquinasas presentes en WAT (HKI y HKII), y una concentración alta (20 mM) para activar preferentemente la enzima glucoquinasa. Durante ambas incubaciones, se tomaron alícuotas de 100 μ L de medio de incubación a lo largo del tiempo para determinar la concentración de glucosa remanente y la producción de lactato. Tanto la concentración de glucosa del medio como la de lactato, se determinaron mediante el autoanalizador PENTRA 400 de ABX, tal y como se describe posteriormente. El consumo de glucosa en los diferentes tiempos se expresó como porcentaje respecto a la glucosa inicial que se añadió (100%). La producción de lactato se expresó como la cantidad de lactato producido en nanomoles/L por miligramo de WAT incubado.

2.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEPCK CITOSÓLICA.

La actividad PEPCK citosólica en el tejido adiposo e hígado se determinó siguiendo el método de *Chang and Lane* (Chang and Lane, 1966). Este método se basa en la carboxilación del fosfoenolpiruvato (P-enolpiruvato) a partir de HCO_3^- y de inosin difosfato (IDP). Además, utiliza la enzima malato deshidrogenasa (MDH) para reducir el oxalacetato producido por la PEPCK a malato, un compuesto más estable a pH ácido.



Las muestras de hígado y tejido adiposo se homogenizaron en 10 volúmenes de tampón homogenado (Glicin-glicina 50 mM, KCl 120 mM, DTT 1 mM, Aprotinina 20U/mL, PMSF 0.1 mM) por peso de muestra para el hígado, y en 5 para el tejido adiposo, para conseguir una concentración de proteínas de aproximadamente 10 mg/dL. Los homogenados se centrifugaron a 10000xg durante 10 minutos a 4°C y, a partir del sobrenadante, se determinó la actividad enzimática y la concentración de proteínas por el método Bradford.

En un volumen de 450 µL de solución de reacción (Imidazol HCl 0.5 mM pH 6.6, IDP 25 mM, MnCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, NADH 50 mM, MDH 125U/mL, ¹⁴CO₃HNa (0,2 µCi/µmol) 50 mM, P-enolpiruvato 1.25 mM) se añadieron 50 µL del sobrenadante del homogenado de hígado o de tejido adiposo, y se dejó incubar 10 minutos a 30°C. La reacción se paró añadiendo un volumen de HCl 2 N. Unos 800 µL de la reacción se calentaron durante una hora a 80°C con el fin de evaporar la muestra. El residuo se resuspendió en 500 µL de agua, se le añadieron 4.5 mL de líquido de centelleo y se determinó la cantidad de malato radioactivo producido. La actividad enzimática PEPCCK se expresó en mU por mg de proteína, y se representó como porcentaje respecto a la actividad enzimática PEPCCK de los animales controles (100%).

2.8. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR A PARTIR DE EXTRACTOS.

Para estudiar las diferentes vías metabólicas que pudieran estar alteradas en los ratones transgénicos aP2-GK, se utilizó la técnica de la resonancia magnética nuclear (RMN) en extractos tisulares enriquecidos con ¹³C-glucosa. Este experimento se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Cerdán (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC, Universidad Autónoma de Madrid). Para ello, se inyectó intraperitonealmente una dosis de 3 gramos de [1-¹³C]-glucosa (99.9% ¹³C) por kg de peso vivo a cinco ratones controles y cinco transgénicos aP2-GK alimentados y anestesiados. Transcurridos 30 minutos, los ratones aún anestesiados se sacrificaron mediante una

irradiación, de 2 segundos a 5 kW, focalizada en el cerebro con un microondas (Muromatsi Co, Tokio, Japan). Posteriormente, se extrajo el tejido adiposo blanco epididimal y el hígado de estos animales y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. La extracción acuosa de ambos tejidos se realizó con ácido perclórico (HClO_4 al 10%) (Cerdan et al., 1986; Cerdan et al., 1990). Los extractos acuosos se neutralizaron, se liofilizaron y se mantuvieron congelados a -20°C hasta su análisis por RMN de ^{13}C . Justo antes del análisis por RMN de los extractos, el liofilizado se resuspendió en un volumen final de 0.5 mL agua deuterada (99.9% $^2\text{H}_2\text{O}$), ajustando su pH a 7.2. Dado que la cantidad de metabolitos en el extracto acuoso del WAT epididimal era muy baja, se mezclaron los cinco extractos acuosos del WAT de cada grupo.

2.8.1. Espectroscopia de la RMN de ^{13}C .

Los espectros del desacoplo de protones de la RMN de ^{13}C se obtuvieron gracias a un espectrómetro de RMN (Bruker AVANCE 500WB), utilizando una sonda comercial de ^1H y ^{13}C de 5 mm, optimizada para la detección directa de la RMN de ^{13}C . Las condiciones a las que se sometieron las muestras para obtener el espectro fueron: 11.9 Tesla, 125.13 MHz a 25°C y pH 7.2. Las condiciones de adquisición de los espectros fueron: $\pi/3$ pulsos, un ancho de espectro de 30.0 kHz, un tiempo de adquisición de 1.09 segundos, un tiempo de reciclado de 6.0 segundos y los datos se exportaron como tabla de datos de 64 k. El desacoplamiento de los protones se registró únicamente durante el tiempo de adquisición, utilizando una secuencia de desacoplamiento pulsátil compuesta de banda ancha (Shaka AJ, 1983). Los desplazamientos químicos se calibraron gracias a un compuesto de referencia externo, el dioxano (10% vol/vol). La asignación de los diferentes picos obtenidos en la resonancia a los diferentes compuestos se basó en los valores de la literatura y la adición de estándares internos (Cerdan et al., 1990). Los espectros obtenidos y las múltiples estructuras se analizaron utilizando el programa informático de RMN para PC *MestRe-C* (Mestrelab Research, Santiago de Compostela).

2.8.2. Asignaciones de las posiciones de la RMN de ^{13}C del WAT y cálculos.

Una vez asignada la referencia externa (dioxano) como la estructura múltiple con mayor intensidad del espectro, se posicionó el resto de estructuras respecto su posición (67.4 ppm). Gracias a la literatura y al asesoramiento del Dr. Cerdán, se asignaron y se posicionaron diferentes compuestos, entre ellos el C3 del lactato (21 ppm) y los isómeros α y β de la [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-glucosa (92 ppm y 96 ppm, respectivamente). El C3 del glicerol-3-P (65.6 ppm) no pudo asignarse dado su presencia indetectable en los espectros de WAT, tanto en ratones controles como en transgénicos aP2-GK. Cualitativamente se comparó el espectro obtenido a partir del WAT epididimal de cinco ratones aP2-GK con el espectro obtenido de cinco ratones controles. Para cuantificar los resultados, se calculó la relación entre las distintas intensidades de las estructuras asignadas respecto la intensidad del dioxano. La intensidad del dioxano sólo depende del tipo de capilar utilizado. Se utilizó el mismo tipo de capilar para todas las muestras para que la intensidad del dioxano fuera independiente de la cantidad de muestra "inyectada" en el espectrómetro de RMN. Sin embargo, la intensidad de los diferentes compuestos sí dependía de la cantidad de muestra. Así, las relaciones de intensidades compuesto/dioxano calculadas se normalizaron por la cantidad, en miligramos, de tejido adiposo procesado en cada grupo. La cantidad de [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-glucosa presente en el WAT se obtuvo a partir de la suma de los isómeros de la [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-glucosa, α y β .

Para determinar la concentración de cada uno de los metabolitos asignados en los espectros, se realizó una RMN de ^{13}C a partir de una solución estándar que contenía 20 mM de glucosa, 20 mM de glicerol-3-P y 20 mM de lactato. Como la abundancia de ^{13}C es del 1.1% entre el carbono de la naturaleza, en realidad la solución estándar contenía 0.22 mM de [^{13}C]-glucosa, 0.22 mM de [^{13}C]-glicerol-3-P y 0.22 mM de [^{13}C]-lactato. A partir del espectro de RMN de ^{13}C de esta solución estándar, se cuantificaron las concentraciones de glucosa y lactato intracelulares presentes en el WAT epididimal de animales controles y transgénicos

aP2-GK. Las concentraciones de ambos metabolitos se expresaron como nanomoles x gramo de WAT⁻¹ y se obtuvieron a partir de los extractos perclóricos de 5 animales por cada grupo.

2.9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA CORPORAL.

Para determinar el contenido de grasa corporal se utilizó la carcasa de los ratones siguiendo el método de *Salmon y Flatt* (Salmon and Flatt, 1985). Para la obtención de la carcasa, los ratones se pesaron, se sacrificaron, y se separaron los intestinos y el estómago, pesando finalmente la carcasa. Las carcasas de los animales se digirieron en 50 mL de solución de KOH etanólica al 10% durante 48 horas a 60°C. Tras la digestión, las muestras se pesaron y se tomaron alícuotas de 500 µL de la digestión. A estas alícuotas se les añadió 50 µL de MgCl₂ 5 M y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 16000xg durante 10 minutos. A partir del sobrenadante resultante se determinó la concentración de triglicéridos. Tras determinar la cantidad de grasa corporal total de cada animal, en gramos de triglicéridos, se representó en porcentaje de grasa corporal respecto el peso total de la carcasa previa a la digestión.

2.10. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS HEPÁTICOS.

Para la determinación de los metabolitos hepáticos, las muestras hepáticas se obtuvieron mediante *freeze-clamp*. Para ello, los ratones controles y transgénicos se anestesiaron mediante la inyección intraperitoneal de una solución anestésica. Para la preparación de 10 mL de la solución anestésica, se mezcló 0.5 mL de Rompun[®] (hidroclorato de xylacina al 2%, Bayer, Leverkusen, Germany) con una solución de 2 mL de Imalgene[®] (hidroclorato de ketamina al 0.5%, Merial, Lyon, France) y 7.5 mL de suero fisiológico. Esta solución anestésica se preparó inmediatamente antes de su uso. Para anestesiarse los animales, se inyectó intraperitonealmente 10 µL de solución anestésica por gramo de peso. Mientras el

animal estaba anestesiado, se abrió la cavidad abdominal y las muestras hepáticas se congelaron inmediatamente mediante pinzas enfriadas con nitrógeno líquido (*rapid freeze-clamp*). Así, se evitaron al máximo las alteraciones *post-mortem* en las concentraciones intrahepáticas de los metabolitos, gracias a la inmediata congelación del tejido mientras aún estaba anestesiado el animal. Tras la recogida de las muestras hepáticas, éstas se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento y determinación de los distintos metabolitos.

2.10.1. Determinación del contenido de glucógeno, glucosa-6-fosfato y lactato.

A partir de la misma muestra hepática se determinaron el glucógeno, la glucosa-6-fosfato y el lactato. Fragmentos de hígado de aproximadamente 100 mg se homogenizaron en 10 volúmenes de ácido perclórico frío (HClO₄) al 10% mediante un homogenizador de tipo Polytron®. Tras centrifugar el extracto ácido del hígado a 6000xg durante 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante. A partir de este sobrenadante, se realizaron dos alícuotas de 400 mL cada una. A partir de una alícuota se determinó la cantidad de glucógeno hepático y a partir de la otra, la concentración hepática de lactato y de glucosa-6-fosfato.

2.10.1.1. Determinación del contenido de glucógeno.

El contenido de este polisacárido se determinó mediante el método descrito por *Kepler y Decker* (Kepler D. and Decker K., 1974). Este método se basa en la utilización de la enzima α -amiloglucosidasa para degradar los enlaces del glucógeno, liberando las moléculas de glucosa. La glucosa liberada por esta enzima se determinó espectrofotométricamente mediante el autoanalizador PENTRA 400 de ABX, utilizando el producto comercial *Glucose HK CP* (ABX Diagnostics, Montpellier, France).

Se añadió una gota de indicador universal a los extractos hepáticos para visualizar el pH del extracto y poder ajustarlo a pH 5 con diluciones de HClO₄ 10% y K₂CO₃ 5M. Los tubos

que contenían los 400 μL y la gota del indicador, se pesaron antes y después de ajustar el pH, para determinar así el grado de dilución provocado al ajustar el pH, asumiendo una densidad igual a 1. Una vez ajustado el pH a 5, se tomaron dos alícuotas de 100 μL . A una de ellas, se le añadió 100 μL de solución de α -amiloglucosidasa (10 U/mL en tampón acetato sódico 0.4 M pH 4.8), mientras que a la otra se le añadió 100 μL de solución de tampón acetato sódico 0.4 M pH 4.8. Ambas alícuotas se incubaron durante dos horas en un baño a 50°C y se añadió 250 mL de HClO_4 al 10% para parar la reacción. Finalmente, las muestras se centrifugaron 16000xg durante 10 minutos a 4°C y se determinó la concentración de glucosa en el sobrenadante recuperado. La cantidad de glucógeno hepático se calculó como la diferencia en la concentración de glucosa entre las muestras incubadas con α -amiloglucosidasa respecto a las que no, por peso de hígado y teniendo en cuenta la dilución provocada al ajustar el pH.

2.10.1.2. Determinación del contenido de glucosa-6-fosfato y lactato.

El contenido hepático de estos metabolitos se determinó espectrofotométricamente mediante el autoanalizador PENTRA 400 de ABX. En el caso del lactato hepático, se utilizó el producto comercial *Lactic Acid* de ABX (ABX Diagnostics, Montpellier, France), mientras que para la glucosa-6-fosfato (G6P) se adaptó el método descrito por *Michal* al autoanalizador PENTRA 400 de ABX (Lang G and Michal G., 1974).

Se añadió una gota de indicador universal a los extractos hepáticos para visualizar el pH del extracto y poder ajustarlo a pH 7 con diluciones de HClO_4 10% y K_2CO_3 5M. Los tubos que contenían los 400 μL y la gota del indicador, se pesaron antes y después de ajustar el pH, para determinar así el grado de dilución provocado al ajustar el pH. Una vez ajustado el pH a 7, las muestras se centrifugaron a 16000xg durante 10 minutos a 4°C y se determinó la concentración de G6P y lactato en el sobrenadante recuperado. Ambas cantidades se expresaron por peso de hígado, teniendo en cuenta la dilución provocada al ajustar el pH.

2.10.2. Determinación del contenido de triglicéridos hepáticos.

A partir de las muestras hepáticas obtenidas mediante *freeze-clamp*, se determinó la cantidad de triglicéridos hepáticos utilizando el método descrito por *Carr et al.* (Carr et al., 1993). Los triglicéridos se extrajeron del tejido siguiendo el método de *Folch* utilizando la mezcla cloroformo:metanol (2:1) (Folch et al., 1957). Para ello, fragmentos congelados de hígado de aprox. 100 mg se pesaron y se homogenizaron en 15 mL de cloroformo:metanol (2:1). Las fases acuosas y lipídicas se separaron mediante la adición de 3 mL de H₂SO₄ al 0.05% y mantenidas a 4°C durante toda una noche. Una vez separadas ambas fases, se eliminó la fase superior acuosa con una pipeta Pasteur y se recuperó 1 mL de la fase inferior lipídica en un tubo de vidrio de 5mL. Se añadió 1 mL de una solución de cloroformo/TRITON X-100 al 1% y posteriormente se incubó en un baño a 90°C, para evaporar el cloroformo. Gracias al cloroformo y al TRITON X-100, que es un surfactante no iónico utilizado como detergente para emulsionar los lípidos en fases acuosas, se eliminó de la fase lipídica recuperada cualquier resto de fase acuosa que hubiéramos podido recuperar. Para concentrar la muestra tras la evaporación, se pasó cloroformo por las paredes del tubo de vidrio y se volvió a calentar a 90°C para evaporar el cloroformo. Se repitió nuevamente la adición de cloroformo y el calentamiento a 90°C, para concentrar la muestra en el fondo del tubo de vidrio. Una vez el sedimento estuvo completamente seco y concentrado, se resuspendió en 500 µL de H₂O miliQ en un baño a 37°C, y posteriormente se homogenizó totalmente con la ayuda de la pipeta y/o por agitación. Tras la resuspensión, se determinó la cantidad de triglicéridos y se expresaron en miligramos de triglicéridos por peso de tejido.

2.11. PCR SEMICUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.

Se cuantificaron los niveles de expresión génica en el tejido adiposo mediante la técnica semicuantitativa de la PCR en tiempo real. A partir las muestras congeladas de WAT epididimal, se extrajo el RNA total siguiendo el protocolo comercial del QIAzol[®], como ya se ha descrito. La determinación de los niveles de expresión génica se realizó en dos pasos: un primer paso para obtener el cDNA del WAT epididimal y un segundo paso, la PCR semicuantitativa en tiempo real propiamente dicha. Con el RNA extraído del tejido adiposo, se obtuvo la cadena complementaria de DNA (cDNA) de todos los RNAs mensajeros (mRNA) presentes en las muestras mediante retrotranscripción del mRNA. En un volumen final de 20 μ L y a partir de 1 μ g de RNA total, se obtuvo el cDNA mediante el producto comercial *Omniscript RT[®] kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). También se utilizó *oligo-dT* como cebador de la reacción y el producto comercial *Protector RNase Inhibitor* como inhibidor de RNasas, ambos de Roche (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany).

Una vez obtenido el cDNA procedente del WAT epididimal, se determinó la expresión génica semicuantitativa mediante PCR en tiempo real utilizando el sistema *SmartCycler II[®]* (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) y el producto comercial *QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). Cada reacción de 25 μ L contenía 2 μ L de una dilución 1:10 del cDNA, 12.5 μ L de la *QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Master mix* (MgCl₂ 2.5 mM) y el par de oligonucleótidos o *primers (forward y reverse)*, específicos para cada gen determinado, a una concentración final de 0.4 μ M (Tabla 1).

<i>Genes</i>	<i>Producto</i>	<i>Primer 5' (forward)</i>	<i>Primer 3' (reverse)</i>
<i>Slc2a4</i>	GLUT4	TCAGGCATCAATGCTGTTTTCTAC	TGGCACAGCCACACATGC
<i>Hk2</i>	HK2	GAAGGGGCTAGGAGCTACCA	CTCGGAGCACACGGAAGTT
<i>Pfkfb</i>	PFKM	CATCGCCGTGTTGACCTCTG	ATCGGGCACTTCCAATCAC
<i>Pklr</i>	L-PK	TCAAGGCAGGGATGAACATTG	CACGGGTCTGTAGCTGAGTG
<i>Pdha1</i>	PDHE1	GAAATGTGACCTTCATCGGCT	TGATCCGCCTTTAGCTCCATC
<i>Ldh1</i>	LDH-a	TGTCTCCAGCAAAGACTACTGT	GACTGTAATTGACAATGTTGGGA
<i>Cpt1a</i>	L-CPT1	GCACTGCAGCTCGCACATTACAA	CTCAGACAGTACCTCCTTCAGGAAA
<i>Ppara</i>	PPAR α	TCGGCGAACTATTCGGCTG	GCACTTGTGAAAACGGCAGT
<i>Ppargc1a</i>	PGC-1 α	ATACCCGCAAAGAGCACGAGAAG	CTCAAGAGCAGCGAAAGCGTCACAG
<i>Ucp2</i>	UCP2	ACTTTCCCTCTGGATACCGC	ACGGAGGCAAAGCTCATCTG
<i>Ucp3</i>	UCP3	CTGCACCGCCAGATGAGTTT	ATCATGGCTTGAAATCGGACC
<i>Cox4i2</i>	COX IV	ACTACCCCTTGCTGA	GCCCACAACGTCTTCCATT
<i>Acaca</i>	ACC	TGACAGACTGATCGCAGAGAAAG	TGGAGAGCCCCACACACA
<i>Fasn</i>	FASN	GCTGCGGAAACTCAGAAAT	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
<i>Pparg</i>	PPAR γ	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT
<i>Srebf1</i>	SREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	GCTTCCAGAGAGGAGGCCAG
<i>CD36</i>	CD36	GATGTGGAACCCATAACTGGATTAC	GGTCCCAGTCTCATTATGCCACAGTA
<i>Lipe</i>	HSL	ATGGATTTACGCACGATGACACAG	TAGCGTGACATACTCTTGAGGAA
<i>36B4</i>	36B4	GGCCCTGCACTCTCGCTTT	TGCCAGGACGCGCTTGT

Tabla 1. Primers utilizados en la PCR en tiempo real semicuantitativa. Listado de los oligonucleótidos (*forward* y *reverse*) utilizados en la determinación de la expresión de los diferentes genes.

Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en las PCRs fueron: un primer ciclo de 15 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de amplificación (fase de desnaturalización: 15 segundos a 95°C; fase apareamiento oligonucleótidos: 15 segundos a 60°C; fase de extensión: 30 segundos a 72 °C). La reacción se realizó por triplicado a partir de las muestras de cDNA independientes de tres animales por grupo control y transgénico. La tecnología *SmartCycler II*[®] nos proporcionó, para cada gen analizado, el cálculo de las Cts de cada muestra por cada triplicado. Las Cts corresponden al número de ciclo en que se produce el incremento significativo de la fluorescencia de la reacción, el cual es proporcional al número de moléculas de cDNA iniciales. A partir de estas Cts, se calculó el nivel de expresión génica de los distintos genes analizados en ambos grupos de animales mediante la fórmula matemática descrita por *Pfaffl* (Pfaffl, 2001). Para observar diferencias en la expresión génica entre ambos grupos de animales, se estandarizó la expresión de los distintos genes mediante

la cantidad de cDNA total presente en cada muestra. Para determinar la cantidad de cDNA total, se determinaron los niveles de expresión de un gen cuya expresión no fuera alterada por el transgen, gen *housekeeping*. En nuestro calculo, se utilizó la expresión del gen *36B4* como gen *housekeeping*. Los resultados se expresaron como la relación entre el nivel de expresión de un gen en los animales transgénicos y el de los controles, ambos estandarizados por la expresión del gen *36B4* en cada uno ($\text{ratio} = 2^{-\Delta\text{Cts gen (Con-Tg)}} / 2^{-\Delta\text{Cts } 36\text{B4 (Con-Tg)}}$). Así, los datos se representaron como la expresión de mRNA de cada gen en los ratones transgénicos relativa al nivel de expresión de los controles ($\text{ratio}=1$).

2.12. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS.

Para la obtención de suero, los animales se anestesiaron y se sacrificaron por decapitación. Inmediatamente la sangre se recogió en tubos eppendorf no heparinizados y se coaguló mantenida en hielo. Se obtuvo el suero tras la centrifugación de la sangre coagulada a $6000\times g$ durante 15 minutos a 4°C . Para las determinaciones séricas o plasmáticas de metabolitos u hormonas en que no era necesario un gran volumen de muestra, o experimentos a lo largo del tiempo, se extrajeron pequeños volúmenes de sangre a partir de la cola de los ratones vivos. En estos casos, a partir de animales despiertos, se extrajeron unos $100\ \mu\text{L}$ de sangre procedente de la vena de la cola del ratón. Este volumen se recogió en tubos Microvette[®] CB300 (Sarstedt, St Laurent, QC, Canada). En el caso de las determinaciones séricas, se utilizaron Microvette[®] CB300 impregnados con un activador de la coagulación, mientras que para las plasmáticas (lactato y triglicéridos) se utilizaron Microvette[®] CB300 impregnados con fluoride (NaF), un inhibidor de la glucólisis. En ambos casos, los Microvette[®] CB300 se centrifugaron a $6000\times g$ durante 15 minutos a 4°C para recuperar el suero o plasma, según el caso. Tanto el suero como el plasma se mantuvieron congelados a -20°C hasta el momento de la determinación de los diferentes parámetros.

2.12.1. Metabolitos sanguíneos.

2.12.1.1. Glucosa sanguínea.

La glucosa circulante se determinó a partir de una gota de sangre (5 μ L) procedente de la cola de los ratones, mediante el sistema Glucometer Elite[®] (Bayer, Leverkusen, Germany). En el caso de la concentración de glucosa en el medio de incubación, se determinó mediante el autoanalizador PENTRA 400 de ABX utilizando el producto comercial *Glucose HK CP* de ABX (ABX Diagnostics, Montpellier, France).

2.12.1.2. Triglicéridos.

A partir de plasma sanguíneo, extractos hepáticos y extractos procedentes de la digestión de la carcasa, se determinaron los triglicéridos espectrofotométricamente siguiendo el método enzimático GPO-PAP (Fossati and Prencipe, 1982). Este método está basado en la cuantificación del cromógeno quinoneimina (PAP), obtenido a partir de p-clorofenol y 4-aminoantipirina (4-AAP) tras acoplar tres reacciones enzimáticas. Estas tres reacciones enzimáticas están catalizadas por las enzimas glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO) y la peroxidasa. En los diferentes ensayos se utilizó el producto comercial GPO-PAP (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) adaptándolo al autoanalizador COBAS MIRA. Cuando el volumen de muestra era demasiado reducido para el autoanalizador, se adaptó el protocolo para realizarlo manualmente en placas de 96 pocillos y se utilizó un lector de ELISA para la lectura de las absorbancias.

2.12.1.3. Ácidos grasos libres.

Los ácidos grasos no esterificados (FFAs) se determinaron mediante el método enzimático de la acil-CoA sintetasa y acil-CoA oxidasa (ACS-ACOD) utilizando el producto comercial NEFA C (Wako Chemicals, Neuss, Germany) adaptado al autoanalizador COBAS MIRA. Los FFAs se determinaron tanto en suero como en extractos de tejido adiposo y medio

de incubación en los experimentos del tejido adiposo *in vitro*. En los casos de deficiencia en el volumen de suero, se adaptó el protocolo para realizarlo manualmente en placas de 96 pocillos y se utilizó un lector de ELISA para la lectura de las absorbancias.

2.12.1.4. Glicerol.

La concentración de glicerol se determinó enzimáticamente mediante el producto comercial de Roche Molecular Diagnostics adaptado al autoanalizador COBAS MIRA, en suero, en extractos de tejido adiposo y en el medio de incubación.

2.12.1.5. Lactato.

Tanto la determinación del lactato hepático como la concentración de lactato del medio de incubación se realizaron mediante la utilización del producto comercial *Lactic Acid* de ABX (ABX Diagnostics, Montpellier, France) adaptado al autoanalizador PENTRA 400 de ABX. En la determinación de los niveles plasmáticos de lactato se adaptó el protocolo, para realizarlo manualmente en placas de 96 pocillos y se utilizó un lector de ELISA para la lectura de las absorbancias.

2.12.1.6. Cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato).

Los niveles séricos de β -hidroxibutirato se determinaron mediante el autoanalizador COBAS MIRA, utilizando el método colorimétrico del producto comercial *D-3-Hydroxybutiric acid* de Roche (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland).

2.12.2. Hormonas séricas.

Todas las determinaciones hormonales se realizaron a partir de muestras séricas.

2.12.2.1. Insulina.

La insulina circulante se determinó en 100 μ l de suero mediante radioinmunoensayo (RIA) con el producto comercial *INSULIN-CT* (CIS Bio International, Gif-Sur-Yvette, Cedex, France). También se determinó la insulina circulante a partir de 5 μ L de suero utilizando la técnica del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), mediante el producto comercial *Rat Insulin ELISA kit* (Crystal Chemical, Chicago, IL). Los sueros procedentes de animales alimentados con la dieta HFD se diluyeron 1:10 con el diluyente de muestras proporcionado por el kit, ya que el rango de linealidad es de 0.156-10 ng/mL.

2.12.2.2. Leptina.

La concentración de leptina sérica se determinó en 5 μ L de suero mediante ELISA con el producto comercial *Mouse Leptin ELISA kit* (Crystal Chemical, Chicago, IL). Los sueros procedentes de animales alimentados con la dieta HFD se diluyeron 1:10 con el diluyente de muestras proporcionado por el kit, ya que el rango de linealidad es de 0.2-12.8 ng/mL.

2.12.2.3. Citoquinas: TNF- α e IL-6.

Los niveles circulantes de TNF- α e IL-6 también se determinaron mediante ELISA, utilizando los productos comerciales *Murine TNF- α ELISA* y *Murine IL-6 ELISA kit* (ambos son de Diaclone Research, Besançon, France distribuidos por Cell Sciences, Inc.). Para la determinación de los niveles séricos de TNF- α e IL-6 se utilizaron 100 μ L de suero. En los ratones controles, los niveles circulantes de ambas citoquinas son muy bajos, siendo difícilmente detectables.

2.12.2.4. Adiponectina.

Los niveles de adiponectina circulante se determinaron mediante RIA con el producto comercial *Mouse Adiponectin RIA kit* (LINCO Research, St. Charles, Missouri, USA) a partir de 100 μ L de muestra diluida. Como los niveles séricos de adiponectina son muy altos (μ g/mL) y el rango del ensayo es muy bajo (1-100 ng/mL), los sueros se diluyeron 1:1000.

2.13. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.

Tras el sacrificio de los animales, el tejido adiposo blanco (WAT) epididimal, el tejido adiposo marrón (BAT) interescapular y el hígado se fijaron en formalina (formol al 10%) durante 24-48 horas a 4°C, incluidas en parafina y seccionadas (2-3 μ m). Posteriormente, los cortes histológicos se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina. Para ello, las secciones se tiñeron con hematoxilina, se lavaron y se tiñeron de nuevo con eosina. A continuación, las muestras se deshidrataron y se aclararon para posteriormente montar los portaobjetos. Los cortes histológicos se visualizaron al microscopio de campo claro (Nikon Eclipse E800 microscope, Nikon Corp. Tokio, Japan). Se captaron diferentes imágenes por campo en diferentes campos de las secciones de los distintos tejidos, mediante una videocámara conectada a un monitor en color.

2.13.1. Análisis morfométricos.

A partir de cortes histológicos del WAT epididimal teñidos con hematoxilina y eosina, se realizó un estudio morfométrico para profundizar en el estudio del tamaño de los adipocitos blancos de este tejido. En el caso de los animales transgénicos aP2-PEPCK, se determinó manualmente el diámetro de los adipocitos. Para ello, utilizando al menos tres ratones por grupo control y tres por grupo transgénico, se tomaron imágenes de seis campos microscópicos (10X) diferentes por animal. Se utilizó el programa informático *analySIS® 3.0*

(Soft Imaging System Corp., Lakewood, CO, USA) y una cámara para la captación de imágenes (IZASA SA, Barcelona, Spain). Se determinó uno a uno y manualmente, el diámetro en μm de los adipocitos de cada campo. Sin embargo, en el caso de los animales transgénicos aP2-GK, se determinó el tamaño de los adipocitos como el área calculada, utilizando un método similar al de *Chen y Farese* (Chen and Farese, Jr., 2002). Para ello, utilizando al menos tres ratones por grupo, también se tomaron imágenes de seis campos microscópicos (10X) diferentes por animal. Mediante el programa informático *analysis[®]3.0*, las imágenes captadas se transformaron en imagen binaria negro/blanco y se calculó automáticamente el área de los adipocitos presentes en cada campo (μm^2). Se determinó el tamaño de los adipocitos, y la distribución del tamaño de éstos en un histograma como porcentaje del número total de adipocitos contados para cada categoría de tamaño.

2.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Todos los valores utilizados en este trabajo están expresados como media \pm error estándar (SE). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el test de Student-Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbasi, F, Chu, J.W., Lamendola, C., McLaughlin, T., Hayden, J., Reaven, G.M. and Reaven, P.D. (2004). Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes* 53: 585-590.
- Ahima, RS and Flier, J.S. (2000). Leptin. *Annu.Rev.Physiol* 62: 413-437.
- Ahren, B and Pacini, G. (2005). Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for intervention. *Diabetes Obes.Metab* 7: 2-8.
- Akazawa, S, Sun, F., Ito, M., Kawasaki, E. and Eguchi, K. (2000). Efficacy of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23: 1067-1071.
- Alberti, KG, Zimmet, P. and Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 366: 1059-1062.
- Alexandre, JK, Dennis, E.W., Smith, W.G., Amad, K.H., Duncan, W.C. and Austin, R.C. (1962). Blood volume, cardiac output, and distribution of systemic blood flow in extreme obesity. *Cardiovasc.Res.Cent.Bull.* 1: 39-44.
- Antras-Ferry, J, Le Bigot, G., Robin, P., Robin, D. and Forest, C. (1994). Stimulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by fatty acids. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 203: 385-391.
- Argaud, D, Lange, A.J., Becker, T.C., Okar, D.A., el Maghrabi, M.R., Newgard, C.B. and Pilkis, S.J. (1995). Adenovirus-mediated overexpression of liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in gluconeogenic rat hepatoma cells. Paradoxical effect on Fru-2,6-P₂ levels. *J.Biol.Chem.* 270: 24229-24236.
- Arita, Y, Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 257: 79-83.
- Bachman, ES, Dhillon, H., Zhang, C.Y., Cinti, S., Bianco, A.C., Kobilka, B.K. and Lowell, B.B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 297: 843-845.
- Bajaj, M and DeFronzo, R.A. (2003). Metabolic and molecular basis of insulin resistance. *J.Nucl.Cardiol.* 10: 311-323.
- Ballard, FJ, Hanson, R.W. and Leveille, G.A. (1967). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 242: 2746-2750.
- Bartness, TJ and Bamshad, M. (1998). Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am.J.Physiol* 275: R1399-R1411.

Bays, H, Mandarino, L. and DeFronzo, R.A. (2004). Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89: 463-478.

Beale, EG, Hammer, R.E., Antoine, B. and Forest, C. (2004). Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends Endocrinol.Metab* 15: 129-135.

Beale, EG and Tishler, E.J. (1992). Expression and regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 189: 925-930.

Bell, CG, Walley, A.J. and Froguel, P. (2005). The genetics of human obesity. *Nat.Rev.Genet.* 6: 221-234.

Birnboim, HC and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Bjorntorp, P (1974). Size, number and function of adipose tissue cells in human obesity. *Horm.Metab Res. Suppl* 4: 77-83.

Bluher, M, Kratzsch, J. and Paschke, R. (2001). Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha, angiotensin II, growth hormone, and IGF-I are not elevated in insulin-resistant obese individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 24: 328-334.

Boden, G, Chen, X., Ruiz, J., White, J.V. and Rossetti, L. (1994). Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J.Clin.Invest* 93: 2438-2446.

Botion, LM, Kettelhut, I.C. and Migliorini, R.H. (1995). Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. *Horm.Metab Res.* 27: 310-313.

Brito, MN, Brito, N.A., Brito, S.R., Moura, M.A., Kawashita, N.H., Kettelhut, I.C. and Migliorini, R.H. (1999). Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Am.J.Physiol* 276: R1003-R1009.

Browning, JD and Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J.Clin.Invest* 114: 147-152.

Bruun, JM, Lihn, A.S., Verdich, C., Pedersen, S.B., Toubro, S., Astrup, A. and Richelsen, B. (2003). Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 285: E527-E533.

Cadoudal, T, Leroyer, S., Reis, A.F., Tordjman, J., Durant, S., Fouque, F., Collinet, M., Quette, J., Chauvet, G., Beale, E., Velho, G., Antoine, B., Benelli, C. and Forest, C. (2005). Proposed involvement of adipocyte glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the metabolic syndrome. *Biochimie* 87: 27-32.

Cannon, B and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84: 277-359.

- Carr, TP, Andresen, C.J. and Rudel, L.L. (1993). Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin.Biochem.* 26: 39-42.
- Cerdan, S, Kunnecke, B. and Seelig, J. (1990). Cerebral metabolism of [1,2-¹³C₂]acetate as detected by in vivo and in vitro ¹³C NMR. *J.Biol.Chem.* 265: 12916-12926.
- Cerdan, S, Subramanian, V.H., Hilberman, M., Cone, J., Egan, J., Chance, B. and Williamson, J.R. (1986). ³¹P NMR detection of mobile dog brain phospholipids. *Magn Reson.Med.* 3: 432-439.
- Chang, HC and Lane, M.D. (1966). The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. II. Purification and properties of liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J.Biol.Chem.* 241: 2413-2420.
- Chen, D and Garg, A. (1999). Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. *J.Lipid Res.* 40: 1735-1746.
- Chen, HC and Farese, R.V., Jr. (2002). Determination of adipocyte size by computer image analysis. *J.Lipid Res.* 43: 986-989.
- Chomczynski, P and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162: 156-159.
- Cinti, S (2002). Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J.Endocrinol.Invest* 25: 823-835.
- Cinti, S (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 73: 9-15.
- Collins, S, Kuhn, C.M., Petro, A.E., Swick, A.G., Chrnyk, B.A. and Surwit, R.S. (1996). Role of leptin in fat regulation. *Nature* 380: 677-
- Consoli, A, Nurjhan, N., Capani, F. and Gerich, J. (1989). Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* 38: 550-557.
- Crandall, DL, Francendese, A.A. and DiGirolamo, M. (1986). Effects of glucose, insulin and epinephrine on lactate metabolism by isolated adipocytes. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 52: 395-398.
- Crandall, DL, Fried, S.K., Francendese, A.A., Nickel, M. and DiGirolamo, M. (1983). Lactate release from isolated rat adipocytes: influence of cell size, glucose concentration, insulin and epinephrine. *Horm.Metab Res.* 15: 326-329.
- Crandall, DL, Hausman, G.J. and Kral, J.G. (1997). A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation.* 4: 211-232.
- Cusi, KJ, Pratipanawat, T., Koval, J., Printz, R., Ardehali, H., Granner, D.K., DeFronzo, R.A. and Mandarino, L.J. (2001). Exercise increases hexokinase II mRNA, but not activity in obesity and type 2 diabetes. *Metabolism* 50: 602-606.

Dandona, P, Aljada, A. and Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 25: 4-7.

de Wet, JR, Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R. and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.* 7: 725-737.

DeFronzo, RA (1997). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth.J.Med.* 50: 191-197.

DeFronzo, RA, Ferrannini, E., Hendler, R., Felig, P. and Wahren, J. (1983). Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia in man. *Diabetes* 32: 35-45.

Desvergne, B and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr.Rev.* 20: 649-688.

Devine, JH, Eubank, D.W., Clouthier, D.E., Tontonoz, P., Spiegelman, B.M., Hammer, R.E. and Beale, E.G. (1999). Adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter requires peroxisome proliferator-activated receptor gamma and 9-cis-retinoic acid receptor binding to an adipocyte-specific enhancer in vivo. *J.Biol.Chem.* 274: 13604-13612.

DiGirolamo, M, Fine, J.B., Tagra, K. and Rossmanith, R. (1998). Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am.J.Physiol* 274: R1460-R1467.

DiGirolamo, M, Newby, F.D. and Lovejoy, J. (1992). Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. *FASEB J.* 6: 2405-2412.

Duplus, E, Benelli, C., Reis, A.F., Fouque, F., Velho, G. and Forest, C. (2003). Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in human adipose tissue: induction by rosiglitazone and genetic analyses of the adipocyte-specific region of the promoter in type 2 diabetes. *Biochimie* 85: 1257-1264.

Fabris, R, Nisoli, E., Lombardi, A.M., Tonello, C., Serra, R., Granzotto, M., Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Federspil, G., Carruba, M.O. and Vettor, R. (2001). Preferential channeling of energy fuels toward fat rather than muscle during high free fatty acid availability in rats. *Diabetes* 50: 601-608.

Faintrenie, G and Geloën, A. (1996). Lactate production by white adipocytes in relation to insulin sensitivity. *Am.J.Physiol* 270: C1061-C1066.

Fajas, L, Fruchart, J.C. and Auwerx, J. (1998). PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 438: 55-60.

Fasshauer, M and Paschke, R. (2003). Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 46: 1594-1603.

Ferre, P, Leturque, A., Burnol, A.F., Penicaud, L. and Girard, J. (1985). A method to quantify glucose utilization in vivo in skeletal muscle and white adipose tissue of the anaesthetized rat. *Biochem.J.* 228: 103-110.

Ferre, T, Pujol, A., Riu, E., Bosch, F. and Valera, A. (1996a). Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 7225-7230.

Ferre, T, Riu, E., Bosch, F. and Valera, A. (1996b). Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J.* 10: 1213-1218.

Ferre, T, Riu, E., Franckhauser, S., Agudo, J. and Bosch, F. (2003). Long-term overexpression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance. *Diabetologia* 46: 1662-1668.

Folch, J, Lees, M. and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226: 497-509.

Forest, C, Franckhauser, S., Glorian, M., Antras-Ferry, J., Robin, D. and Robin, P. (1997). Regulation of gene transcription by fatty acids, fibrates and prostaglandins: the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene as a model. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 57: 47-56.

Forest, C, Tordjman, J., Glorian, M., Duplus, E., Chauvet, G., Quette, J., Beale, E.G. and Antoine, B. (2003). Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem.Soc.Trans.* 31: 1125-1129.

Forman, BM, Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M. and Evans, R.M. (1-12-1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83: 803-812.

Fossati, P and Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin.Chem.* 28: 2077-2080.

Francendese, AA and DiGirolamo, M. (1981). Alternative substrates for triacylglycerol synthesis in isolated adipocytes of different size from the rat. *Biochem.J.* 194: 377-384.

Franckhauser, S, Antras-Ferry, J., Robin, P., Robin, D., Granner, D.K. and Forest, C. (1995). Expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in 3T3-F442A adipose cells: opposite effects of dexamethasone and isoprenaline on transcription. *Biochem.J.* 305 (Pt 1): 65-71.

Fruebis, J, Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E. and Lodish, H.F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 2005-2010.

Fruhbeck, G and Salvador, J. (2000). Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia* 43: 3-12.

Garber, AJ, Ballard, F.J. and Hanson, R.W. (1972). Energy metabolism and the regulation of metabolic processes in mitochondria. 109-135.

- Gavrilova, O, Marcus-Samuels, B., Graham, D., Kim, J.K., Shulman, G.I., Castle, A.L., Vinson, C., Eckhaus, M. and Reitman, M.L. (2000). Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J.Clin.Invest* 105: 271-278.
- Giordano, A, Frontini, A., Castellucci, M. and Cinti, S. (2004). Presence and distribution of cholinergic nerves in rat mediastinal brown adipose tissue. *J.Histochem.Cytochem.* 52: 923-930.
- Giordano, A, Morroni, M., Carle, F., Gesuita, R., Marchesi, G.F. and Cinti, S. (1998). Sensory nerves affect the recruitment and differentiation of rat periovarian brown adipocytes during cold acclimation. *J.Cell Sci.* 111 (Pt 17): 2587-2594.
- Girard, J, Ferre, P. and Foufelle, F. (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu.Rev.Nutr.* 17: 325-352.
- Glorian, M, Duplus, E., Beale, E.G., Scott, D.K., Granner, D.K. and Forest, C. (2001). A single element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene mediates thiazolidinedione action specifically in adipocytes. *Biochimie* 83: 933-943.
- Gonzalez, C, Ureta, T., Sanchez, R. and Niemeyer, H. (1964). Multiple molecular forms of ATP:hexose 6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 16: 347-352.
- Goto, T, Onuma, T., Takebe, K. and Kral, J.G. (1995). The influence of fatty liver on insulin clearance and insulin resistance in non-diabetic Japanese subjects. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 19: 841-845.
- Granner, D, Andreone, T., Sasaki, K. and Beale, E. (1983). Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *Nature* 305: 549-551.
- Graves, RA, Tontonoz, P., Platt, K.A., Ross, S.R. and Spiegelman, B.M. (1992). Identification of a fat cell enhancer: analysis of requirements for adipose tissue-specific gene expression. *J.Cell Biochem.* 49: 219-224.
- Guan, HP, Li, Y., Jensen, M.V., Newgard, C.B., Steppan, C.M. and Lazar, M.A. (2002). A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat.Med.* 8: 1122-1128.
- Hagstrom, E, Arner, P., Ungerstedt, U. and Bolinder, J. (1990). Subcutaneous adipose tissue: a source of lactate production after glucose ingestion in humans. *Am.J.Physiol* 258: E888-E893.
- Hanahan, D (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166: 557-580.
- Hanson, RW (1965). Interrelationship of ketone body metabolism and glucose utilization by adipose tissue in vitro. *Arch.Biochem.Biophys.* 109: 98-103.
- Hanson, RW and Garber, A.J. (1972). Phosphoenolpyruvate carboxykinase. I. Its role in gluconeogenesis. *Am.J.Clin.Nutr.* 25: 1010-1021.

Hanson, RW and Reshef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu.Rev.Biochem.* 66: 581-611.

Hanson, RW and Reshef, L. (2003). Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* 85: 1199-1205.

Hauner, H (2002). The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res.Rev.* 18 Suppl 2: S10-S15.

Hausman, DB, DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J. and Martin, R.J. (2001). The biology of white adipocyte proliferation. *Obes.Rev.* 2: 239-254.

Haynes, WG, Morgan, D.A., Walsh, S.A., Mark, A.L. and Sivitz, W.I. (1997). Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J.Clin.Invest* 100: 270-278.

Hazel, M, Cooksey, R.C., Jones, D., Parker, G., Neidigh, J.L., Witherbee, B., Gulve, E.A. and McClain, D.A. (2004). Activation of the hexosamine signaling pathway in adipose tissue results in decreased serum adiponectin and skeletal muscle insulin resistance. *Endocrinology* 145: 2118-2128.

Heilbronn, L, Smith, S.R. and Ravussin, E. (2004). Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 28 Suppl 4: S12-S21.

Hennes, MM, Shrago, E. and Kissebah, A.H. (1990). Receptor and postreceptor effects of free fatty acids (FFA) on hepatocyte insulin dynamics. *Int.J.Obes.* 14: 831-841.

Hirsch, J and Batchelor, B. (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin.Endocrinol.Metab* 5: 299-311.

Hopgood, MF, Ballard, F.J., Reshef, L. and Hanson, R.W. (1973). Synthesis and degradation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver and adipose tissue.Changes during a starvation-refeeding cycle. *Biochem.J.* 134: 445-452.

Hotamisligil, GS, Shargill, N.S. and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91.

Hotta, K, Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T. and Matsuzawa, Y. (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20: 1595-1599.

Hu, E, Liang, P. and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J.Biol.Chem.* 271: 10697-10703.

IDF (2004). International Diabetes Federation. World Diabetes Day 2004. Fight Obesity Prevent Diabetes.

Ingalls, AM, Dickie, M.M. and Snell, G.D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J.Hered.* 41: 317-318.

James, PT (2004). Obesity: the worldwide epidemic. *Clin.Dermatol.* 22: 276-280.

Jansson, PA, Smith, U. and Lonroth, P. (1990). Evidence for lactate production by human adipose tissue in vivo. *Diabetologia* 33: 253-256.

Jensen, MD (1997a). Health consequences of fat distribution. *Horm.Res.* 48 Suppl 5: 88-92.

Jensen, MD (1997b). Lipolysis: contribution from regional fat. *Annu.Rev.Nutr.* 17: 127-139.

Johnson, PR, Stern, J.S., Greenwood, M.R. and Hirsch, J. (1978). Adipose tissue hyperplasia and hyperinsulinemia on Zucker obese female rats: a developmental study. *Metabolism* 27: 1941-1954.

Joost, HG and Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol.Membr.Biol.* 18: 247-256.

Kahn, BB and Flier, J.S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J.Clin.Invest* 106: 473-481.

Kahn, R, Buse, J., Ferrannini, E. and Stern, M. (2005). The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 28: 2289-2304.

Kakuma, T, Wang, Z.W., Pan, W., Unger, R.H. and Zhou, Y.T. (2000). Role of leptin in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 expression. *Endocrinology* 141: 4576-4582.

Katz, J, Wals, P. and Lee, W.N. (1993). Isotopomer studies of gluconeogenesis and the Krebs cycle with ¹³C-labeled lactate. *J.Biol.Chem.* 268: 25509-25521.

Katzen, HM and Schimke, R.T. (1965). Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 54: 1218-1225.

Kawai, T, Takei, I., Oguma, Y., Ohashi, N., Tokui, M., Oguchi, S., Katsukawa, F., Hirose, H., Shimada, A., Watanabe, K. and Saruta, T. (1999). Effects of troglitazone on fat distribution in the treatment of male type 2 diabetes. *Metabolism* 48: 1102-1107.

Kelley, DE, Mookan, M., Simoneau, J.A. and Mandarino, L.J. (1993). Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J.Clin.Invest* 92: 91-98.

Kelly, IE, Han, T.S., Walsh, K. and Lean, M.E. (1999). Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22: 288-293.

Kelly, LJ, Vicario, P.P., Thompson, G.M., Candelore, M.R., Doebber, T.W., Ventre, J., Wu, M.S., Meurer, R., Forrest, M.J., Conner, M.W., Cascieri, M.A. and Moller, D.E. (1998). Peroxisome

proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology* 139: 4920-4927.

Keppler D. and Decker K. (1974). Glycogen: determination with amyloglucosidase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 3: 1127-1131.

Kern, PA, Ranganathan, S., Li, C., Wood, L. and Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 280: E745-E751.

Kern, PA, Saghizadeh, M., Ong, J.M., Bosch, R.J., Deem, R. and Simsolo, R.B. (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J.Clin.Invest* 95: 2111-2119.

Kim, JB and Spiegelman, B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 10: 1096-1107.

Kim, JB, Wright, H.M., Wright, M. and Spiegelman, B.M. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 4333-4337.

King, JL and DiGirolamo, M. (1998). Lactate production from glucose and response to insulin in perfused adipocytes from mesenteric and epididymal regions of lean and obese rats. *Obes.Res.* 6: 69-75.

Kissebah, AH, Alfarsi, S., Adams, P.W. and Wynn, V. (1976). Role of insulin resistance in adipose tissue and liver in the pathogenesis of endogenous hypertriglyceridaemia in man. *Diabetologia* 12: 563-571.

Kissebah, AH, Vydellingum, N., Murray, R., Evans, D.J., Hartz, A.J., Kalkhoff, R.K. and Adams, P.W. (1982). Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 54: 254-260.

Koistinen, HA, Bastard, J.P., Dusserre, E., Ebeling, P., Zegari, N., Andreelli, F., Jardel, C., Donner, M., Meyer, L., Moulin, P., Hainque, B., Riou, J.P., Laville, M., Koivisto, V.A. and Vidal, H. (2000). Subcutaneous adipose tissue expression of tumour necrosis factor-alpha is not associated with whole body insulin resistance in obese nondiabetic or in type-2 diabetic subjects. *Eur.J.Clin.Invest* 30: 302-310.

Lackner, R, Challiss, R.A., West, D. and Newsholme, E.A. (1984). A problem in the radiochemical assay of glucose-6-phosphatase in muscle. *Biochem.J.* 218: 649-651.

Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lafontan, M (2005). Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu.Rev Pharmacol.Toxicol.* 45: 119-146.

Lafontan, M and Berlan, M. (2003). Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol.Sci.* 24: 276-283.

Lang G and Michal G. (1974). D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphatase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 3: 1238-1242.

Lee, Y, Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D. and Unger, R.H. (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: 10878-10882.

Lee, Y, Yu, X., Gonzales, F., Mangelsdorf, D.J., Wang, M.Y., Richardson, C., Witters, L.A. and Unger, R.H. (2002). PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 11848-11853.

Lehmann, JM, Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M. and Kliewer, S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J.Biol.Chem.* 270: 12953-12956.

Lev-Ran, A (2001). Human obesity: an evolutionary approach to understanding our bulging waistline. *Diabetes Metab Res.Rev.* 17: 347-362.

Li, J, Yu, X., Pan, W. and Unger, R.H. (2002). Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 282: E1334-E1341.

Lihn, AS, Bruun, J.M., He, G., Pedersen, S.B., Jensen, P.F. and Richelsen, B. (2004). Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol.Cell Endocrinol.* 219: 9-15.

Liu, LS, Spelleken, M., Rohrig, K., Hauner, H. and Eckel, J. (1998). Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 47: 515-522.

Lopez, IP, Milagro, F.I., Marti, A., Moreno-Aliaga, M.J., Martinez, J.A. and De Miguel, C. (2004). Gene expression changes in rat white adipose tissue after a high-fat diet determined by differential display. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 318: 234-239.

Lovejoy, J, Mellen, B. and DiGirolamo, M. (1990). Lactate generation following glucose ingestion: relation to obesity, carbohydrate tolerance and insulin sensitivity. *Int.J.Obes.* 14: 843-855.

Lovejoy, J, Newby, F.D., Gebhart, S.S. and DiGirolamo, M. (1992). Insulin resistance in obesity is associated with elevated basal lactate levels and diminished lactate appearance following intravenous glucose and insulin. *Metabolism* 41: 22-27.

Lowell, BB and Bachman, E.S. (2003). Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J.Biol.Chem.* 278: 29385-29388.

Maffei, M, Fei, H., Lee, G.H., Dani, C., Leroy, P., Zhang, Y., Proenca, R., Negrel, R., Ailhaud, G. and Friedman, J.M. (1995). Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 6957-6960.

Makowski, L, Boord, J.B., Maeda, K., Babaev, V.R., Uysal, K.T., Morgan, M.A., Parker, R.A., Suttles, J., Fazio, S., Hotamisligil, G.S. and Linton, M.F. (2001). Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat.Med.* 7: 699-705.

Marin, P, Rebuffe-Scrive, M., Smith, U. and Bjorntorp, P. (1987). Glucose uptake in human adipose tissue. *Metabolism* 36: 1154-1160.

Martinez, JA, Moreno, B. and Martinez-Gonzalez, M.A. (2004). Prevalence of obesity in Spain. *Obes.Rev.* 5: 171-172.

Massa, L, Baltrusch, S., Okar, D.A., Lange, A.J., Lenzen, S. and Tiedge, M. (2004). Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes* 53: 1020-1029.

McClain, DA, Hazel, M., Parker, G. and Cooksey, R.C. (2005). Adipocytes with increased hexosamine flux exhibit insulin resistance, increased glucose uptake, and increased synthesis and storage of lipid. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 288: E973-E979.

McGarry, JD and Dobbins, R.L. (1999). Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42: 128-138.

Meyuhas, O, Reshef, L., Gunn, J.M., Hanson, R.W. and Ballard, F.J. (1976). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in adipose tissue in vivo by glucocorticoids and insulin. *Biochem.J.* 158: 1-7.

Miner, JL (2004). The adipocyte as an endocrine cell. *J.Anim Sci.* 82: 935-941.

Minokoshi, Y, Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Muller, C., Carling, D. and Kahn, B.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-343.

Mohamed-Ali, V, Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D.R., Miles, J.M., Yudkin, J.S., Klein, S. and Coppel, S.W. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82: 4196-4200.

Moitra, J, Mason, M.M., Olive, M., Krylov, D., Gavrillova, O., Marcus-Samuels, B., Feigenbaum, L., Lee, E., Aoyama, T., Eckhaus, M., Reitman, M.L. and Vinson, C. (1998). Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* 12: 3168-3181.

Moller, DE (2000). Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol.Metab* 11: 212-217.

Montague, CT and O'Rahilly, S. (2000). The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49: 883-888.

Mora, S and Pessin, J.E. (2002). An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Res.Rev.* 18: 345-356.

Mori, Y, Murakawa, Y., Okada, K., Horikoshi, H., Yokoyama, J., Tajima, N. and Ikeda, Y. (1999). Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22: 908-912.

Munoz-Alonso, MJ, Guillemain, G., Kassis, N., Girard, J., Burnol, A.F. and Leturque, A. (2000). A novel cytosolic dual specificity phosphatase, interacting with glucokinase, increases glucose phosphorylation rate. *J.Biol.Chem.* 275: 32406-32412.

Nagy A. (2002). *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual.* 3 edition:

NCEP (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285: 2486-2497.

Nechushtan, H, Benvenisty, N., Brandeis, R. and Reshef, L. (1987). Glucocorticoids control phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in a tissue specific manner. *Nucleic Acids Res.* 15: 6405-6417.

Newby, FD, Wilson, L.K., Thacker, S.V. and DiGirolamo, M. (1990). Adipocyte lactate production remains elevated during refeeding after fasting. *Am.J.Physiol* 259: E865-E871.

NIH (2004). Strategic Plan For the NIH Obesity Research.

Nonogaki, K, Fuller, G.M., Fuentes, N.L., Moser, A.H., Staprans, I., Grunfeld, C. and Feingold, K.R. (1995). Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 136: 2143-2149.

Nonogaki, K, Strack, A.M., Dallman, M.F. and Tecott, L.H. (1998). Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene. *Nat.Med.* 4: 1152-1156.

Nordlie, RC and Lardy, H.A. (1963). Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *J.Biol.Chem.* 238: 2259-2263.

Olefsky, JM (2000). Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J.Clin.Invest* 106: 467-472.

Olswang, Y, Cohen, H., Papo, O., Cassuto, H., Croniger, C.M., Hakimi, P., Tilghman, S.M., Hanson, R.W. and Reshef, L. (2002). A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 625-630.

Otaegui, PJ, Ferre, T., Pujol, A., Riu, E., Jimenez, R. and Bosch, F. (2000). Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia. *Hum.Gene Ther.* 11: 1543-1552.

Pfaffl, MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45-

Picard, F, Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P. and Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 111: 931-941.

Pickup, JC, Mattock, M.B., Chusney, G.D. and Burt, D. (1997). NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40: 1286-1292.

Pond, CM (1996). Functional interpretation of the organization of mammalian adipose tissue: its relationship to the immune system. *Biochem.Soc.Trans.* 24: 393-400.

Portillo, MP, Serra, F., Simon, E., del Barrio, A.S. and Palou, A. (1998). Energy restriction with high-fat diet enriched with coconut oil gives higher UCP1 and lower white fat in rats. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 22: 974-979.

Pradhan, AD, Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E. and Ridker, P.M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286: 327-334.

Printz, RL, Magnuson, M.A. and Granner, D.K. (1993). Mammalian glucokinase. *Annu.Rev.Nutr.* 13: 463-496.

Puigserver, P, Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839.

Raben, DM and Baldassare, J.J. (2005). A new lipase in regulating lipid mobilization: hormone-sensitive lipase is not alone. *Trends Endocrinol.Metab* 16: 35-36.

Rangwala, SM and Lazar, M.A. (2000). Transcriptional control of adipogenesis. *Annu.Rev.Nutr.* 20: 535-559.

Raz, I, Eldor, R., Cernea, S. and Shafir, E. (2005). Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage. *Diabetes Metab Res.Rev.* 21: 3-14.

Reaven, GM (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607.

Reshef, L, Hanson, R.W., and Ballard, F.J. (1970). A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 245: 5979-5984.

Reshef, L, Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M. and Hanson, R.W. (15-8-2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J.Biol.Chem.* 278: 30413-30416.

Rippe, C, Berger, K., Boiers, C., Ricquier, D. and Erlanson-Albertsson, C. (2000). Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 279: E293-E300.

Rizzo, MA, Magnuson, M.A., Drain, P.F. and Piston, D.W. (2002). A functional link between glucokinase binding to insulin granules and conformational alterations in response to glucose and insulin. *J.Biol.Chem.* 277: 34168-34175.

Rosen, ED and Spiegelman, B.M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 16: 145-171.

Ross, SR, Graves, R.A., Greenstein, A., Platt, K.A., Shyu, H.L., Mellovitz, B. and Spiegelman, B.M. (1990). A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87: 9590-9594.

Rossetti, L, Barzilai, N., Chen, W., Harris, T., Yang, D. and Rogler, C.E. (1996). Hepatic overexpression of insulin-like growth factor-II in adulthood increases basal and insulin-stimulated glucose disposal in conscious mice. *J.Biol.Chem.* 271: 203-208.

Rothwell, NJ and Stock, M.J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281: 31-35.

Rotter, V, Nagaev, I. and Smith, U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J.Biol.Chem.* 278: 45777-45784.

Rousset, S, Alves-Guerra, M.C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.M., Bouillaud, F. and Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1: S130-S135.

Salmon, DM and Flatt, J.P. (1985). Effect of dietary fat content on the incidence of obesity among ad libitum fed mice. *Int.J.Obes.* 9: 443-449.

Saloranta, C, Franssila-Kallunki, A., Ekstrand, A., Taskinen, M.R. and Groop, L. (1991). Modulation of hepatic glucose production by non-esterified fatty acids in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34: 409-415.

Saltiel, AR and Olefsky, J.M. (1996). Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 45: 1661-1669.

Sandqvist, MM, Eriksson, J.W. and Jansson, P.A. (2001). Increased lactate release per fat cell in normoglycemic first-degree relatives of individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 2344-2348.

Scherer, PE, Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 270: 26746-26749.

Schwartz, MB and Puhl, R. (2003). Childhood obesity: a societal problem to solve. *Obes.Rev.* 4: 57-71.

Schwartz, MW and Porte, D., Jr. (2005). Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307: 375-379.

Sears, IB, MacGinnitie, M.A., Kovacs, L.G. and Graves, R.A. (1996). Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol.Cell Biol.* 16: 3410-3419.

Sebastian, S, Edassery, S. and Wilson, J.E. (2001). The human gene for the type III isozyme of hexokinase: structure, basal promoter, and evolution. *Arch.Biochem.Biophys.* 395: 113-120.

Seip, M and Trygstad, O. (1996). Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). *Acta Paediatr.Suppl* 413: 2-28.

Sell, H, Deshaies, Y. and Richard, D. (2004). The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 36: 2098-2104.

Senn, JJ, Klover, P.J., Nowak, I.A. and Mooney, R.A. (2002). Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51: 3391-3399.

Seppala-Lindroos, A, Vehkavaara, S., Hakkinen, A.M., Goto, T., Westerbacka, J., Sovijarvi, A., Halavaara, J. and Yki-Jarvinen, H. (2002). Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87: 3023-3028.

Sethi, JK and Hotamisligil, G.S. (1999). The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin.Cell Dev.Biol.* 10: 19-29.

Shaka AJ, KJFR (1983). Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16. *Mag.Res.Med.* 53: 313-340.

Shepherd, PR, Gnudi, L., Tozzo, E., Yang, H., Leach, F. and Kahn, B.B. (1993). Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 268: 22243-22246.

Shimomura, I, Hammer, R.E., Ikemoto, S., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401: 73-76.

Sokoloff, L, Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O. and Shinohara, M. (1977). The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J.Neurochem.* 28: 897-916.

Somogyi M. (1945). Determination of blood sugar. *J.Biol.Chem.* 160: 69-73.

Stephens, TW, Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A. and . (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377: 530-532.

Stubbs, M, Aiston, S. and Agius, L. (2000). Subcellular localization, mobility, and kinetic activity of glucokinase in glucose-responsive insulin-secreting cells. *Diabetes* 49: 2048-2055.

Surwit, RS, Kuhn, C.M., Cochrane, C., McCubbin, J.A. and Feinglos, M.N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 37: 1163-1167.

Tanaka, T, Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16: 7432-7443.

Thacker, SV, Nickel, M. and DiGirolamo, M. (1987). Effects of food restriction on lactate production from glucose by rat adipocytes. *Am.J.Physiol* 253: E336-E342.

Tippett, PS and Neet, K.E. (1982). An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A. *J.Biol.Chem.* 257: 12846-12852.

Tomas, E, Tsao, T.S., Saha, A.K., Murrey, H.E., Zhang, C.C., Itani, S.I., Lodish, H.F. and Ruderman, N.B. (2002). Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 16309-16313.

Tontonoz, P, Hu, E., Devine, J., Beale, E.G. and Spiegelman, B.M. (1995). PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol.Cell Biol.* 15: 351-357.

Tordjman, J, Chauvet, G., Quette, J., Beale, E.G., Forest, C. and Antoine, B. (2003). Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. *J.Biol.Chem.* 278: 18785-18790.

Tosh, D and Slack, J.M. (2002). How cells change their phenotype. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3: 187-194.

Towle, HC, Kaytor, E.N. and Shih, H.M. (1997). Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu.Rev.Nutr.* 17: 405-433.

Toyoda, Y, Yoshie, S., Shironoguchi, H. and Miwa, I. (1999). Glucokinase is concentrated in insulin-secretory granules of pancreatic B-cells. *Histochem.Cell Biol.* 112: 35-40.

Tozzo, E, Shepherd, P.R., Gnudi, L. and Kahn, B.B. (1995). Transgenic GLUT-4 overexpression in fat enhances glucose metabolism: preferential effect on fatty acid synthesis. *Am.J.Physiol* 268: E956-E964.

Trayhurn, P and Beattie, J.H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc.Nutr.Soc.* 60: 329-339.

Trayhurn, P, Thomas, M.E., Duncan, J.S. and Rayner, D.V. (1995). Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett.* 368: 488-490.

Tsigos, C, Papanicolaou, D.A., Kyrou, I., Defensor, R., Mitsiadis, C.S. and Chrousos, G.P. (1997). Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82: 4167-4170.

Unger, RH (1991). Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* 251: 1200-1205.

Unger, RH (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44: 863-870.

Unger, RH (2003). Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 144: 5159-5165.

Utter, MF and Kurahashi, K. (1954). Purification of oxalacetic carboxylase from chicken liver. *J.Biol.Chem.* 207: 787-802.

Uysal, KT, Wiesbrock, S.M., Marino, M.W. and Hotamisligil, G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389: 610-614.

Valera, A, Pujol, A., Gregori, X., Riu, E., Visa, J. and Bosch, F. (1995). Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis. *FASEB J.* 9: 1067-1078.

Valverde, AM, Benito, M. and Lorenzo, M. (2005). The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. *Acta Physiol Scand.* 183: 59-73.

Vaughan, M. (1962). The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *J.Biol.Chem.* 237: 3354-3358.

Vettor, R, Lombardi, A.M., Fabris, R., Pagano, C., Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Federspil, G. and Jeanrenaud, B. (1997). Lactate infusion in anesthetized rats produces insulin resistance in heart and skeletal muscles. *Metabolism* 46: 684-690.

Vogt, C, Ardehali, H., Iozzo, P., Yki-Jarvinen, H., Koval, J., Maezono, K., Pendergrass, M., Printz, R., Granner, D., DeFronzo, R. and Mandarino, L. (2000). Regulation of hexokinase II expression in human skeletal muscle in vivo. *Metabolism* 49: 814-818.

Vojarova, B, Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P.A., Bogardus, C. and Pratley, R.E. (2001). Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes.Res.* 9: 414-417.

Wang, YX, Lee, C.H., Tjep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H. and Evans, R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113: 159-170.

Watford, M and Fried, S.K. (1991). Adipose tissue metabolism can now be directly studied in vivo. *Trends Biochem.Sci.* 16: 201-202.

WHO (1999). WHO Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus.

Wright, EM (2001). Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 280: F10-F18.

Wu, Z, Xie, Y., Morrison, R.F., Bucher, N.L. and Farmer, S.R. (1998). PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J.Clin.Invest* 101: 22-32.

Xu, H, Hirosumi, J., Uysal, K.T., Guler, A.D. and Hotamisligil, G.S. (2002a). Exclusive action of transmembrane TNF alpha in adipose tissue leads to reduced adipose mass and local but not systemic insulin resistance. *Endocrinology* 143: 1502-1511.

Xu, H, Uysal, K.T., Becherer, J.D., Arner, P. and Hotamisligil, G.S. (2002b). Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes* 51: 1876-1883.

Yamauchi, T, Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B. and Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat.Med.* 8: 1288-1295.

Yamauchi, T, Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M.L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P. and Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat.Med.* 7: 941-946.

Yeh, WC, Cao, Z., Classon, M. and McKnight, S.L. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 9: 168-181.

Yen, TT, Gill, A.M., Frigeri, L.G., Barsh, G.S. and Wolff, G.L. (1994). Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow A(vy)/- mice: ectopic expression of the agouti gene. *FASEB J.* 8: 479-488.

Yoo-Warren, H, Monahan, J.E., Short, J., Short, H., Bruzel, A., Wynshaw-Boris, A., Meisner, H.M., Samols, D. and Hanson, R.W. (1983). Isolation and characterization of the gene coding for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80: 3656-3660.

Zhang, C, Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K., Kudo, T., Engel, J.D., Yamamoto, M. and Takahashi, S. (2005). MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol.Cell Biol.* 25: 4969-4976.

Zhang, Y, Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.

Zhou, YP and Grill, V.E. (1994). Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J.Clin.Invest* 93: 870-876.

Zimmet, P (2002). Addressing the insulin resistance syndrome: a role for the thiazolidinediones. *Trends Cardiovasc.Med.* 12: 354-362.

Zimmet, P, Alberti, K.G. and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787.