

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

Importancia fisiopatológica de las isoformas del receptor de la insulina en el proceso aterosclerótico: mecanismos de protección mediados por UCP-2 y el ácido oleico

Pathophysiological significance of the insulin receptor isoforms in the atherosclerotic process : protection mechanisms mediated by UCP-2 and oleic acid

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Liliana Perdomo Loaiza

Directores

Manuel Benito de las Heras
Almudena Gómez-Hernández

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

Importancia fisiopatológica de las isoformas del receptor de la insulina en el proceso aterosclerótico. Mecanismos de protección mediados por UCP-2 y el ácido oleico

Pathophysiological significance of the insulin receptor isoforms in the atherosclerotic process. Protection mechanisms mediated by UCP-2 and oleic acid

TESIS DOCTORAL

Mención Doctorado Europeo

Liliana PERDOMO LOAIZA

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

Memoria que presenta para Mención Doctor Europeo
por la universidad complutense de Madrid:

Liliana PERDOMO LOAIZA

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de
Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia
de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección:

Vº Bº de los Directores de Tesis

Dr. Manuel Benito de las Heras

Dra. Almudena Gómez-Hernández

Madrid, 2014

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte mediante la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario. Así como a los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación SAF2008/00031 y SAF2011/22555, además de la financiación del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), del Instituto de Salud Carlos III.

A Dios

A mis padres y hermanas

A Math y la familia Gilbert

Con todo cariño y gratitud

1.RESUMEN	
1.1. Summary in English	8
1.2. Resumen en Español	9
2.INTRODUCCIÓN	10
2.1.Resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2	10
2.1.1. Diabetes y su fisiopatología	10
2.1.2. Señalización de la insulina	13
2.1.3. Modelos de resistencia a la insulina	15
2.1.4. Modelos animales carentes del IR de forma específica de tejido (IRKO)	21
2.1.5.Modelo BATIRKO	21
2.2.Obesidad	23
2.2.1. La obesidad en la actualidad	23
2.2.2. La obesidad y la resistencia a la insulina	25
2.2.3. El tejido adiposo blanco	25
2.2.4. El tejido adiposo marrón	26
2.3. Aterosclerosis	27
2.3.1.Estructura y función de los vasos sanguíneos: tipos de células	27
2.3.2. Inicio y desarrollo del proceso aterosclerótico	28
2.3.3. Ruptura de la placa de ateroma y trombosis.....	29
2.3.4. Modelos animales de aterosclerosis y daño vascular.....	30
2.3.5. Moléculas implicadas en la disfunción vascular	31
2.3.6. Moléculas de Adhesión	32
2.3.7. Citoquinas.....	38
2.3.8. Quimioquinas.....	40
2.3.9. Prostanoides y el tromboxano A2.....	45
2.3.10. Las especies reactivas de oxígeno.....	
2.3.11. Inhibidor del activador del plasminógeno 1	
2.3.12. Hormonas.....	
2.3.13. Señalización del NF- κ B	
2.4. Síndrome metabólico y sus complicaciones	47
2.5. Papel de las proteínas desacoplantes (UCPs) en las alteraciones metabólicas	49
2.6. Papel de los ácidos grasos en la alteraciones metabólicas	51

2.6.1. Transporte y clasificación de los ácidos grasos	51
2.6.2. Implicación de los ácidos grasos en la obesidad, citotoxicidad y resistencia a la insulina.....	55
3. OBJETIVOS	57
4. MATERIALES Y MÉTODOS	58
In vivo	58
4.1. Experimentación animal.....	58
4.2. Generación y caracterización génica de los modelos animales.....	58
4.2.1. Sistema Cre-recombinasa	58
4.2.2. Ratones UCP-1 Cre	58
4.2.3. Ratones IR loxP/loxP	59
4.2.4. Ratón BATIRKO: carente del receptor de la insulina específicamente en el tejido adiposo marrón	59
4.3. Caracterización génica de los modelos animales	59
4.4. Diseños de experimentación y tratamientos	61
4.4.1. BATIRKO 33 semanas: dieta estándar y dieta alta en grasa.....	61
4.4.2. BATIRKO de 52 semanas de edad sometidos a dieta estándar.....	61
4.4.3. Ratones con delección de la apolipoproteína E (ApoE-/-) bajo dieta occidental.....	62
4.5. Técnica utilizada en modelos animales	62
4.5.1. Test de tolerancia a la glucosa.....	63
4.5.2. Test de tolerancia a la insulina	63
4.5.3. Señalización de la insulina in vivo	63
4.5.4. Determinación de los perfiles metabólico y lipídico	63
4.5.5. Determinación de la acumulación de lípidos del tejido	64
4.5.6. Reactividad vascular	64
4.5.7. Determinación del anión superóxido en la aorta	65
In vitro	65
4.6. Cultivo celular	65
4.6.1. Generación de líneas celulares y medios de cultivo	65
4.6.2. Cardiomiocitos neonatales	66
4.6.3. Células de músculo liso vascular	66
4.6.4. Cultivo de células endoteliales aórticas de ratón (MAECs)	67

4.6.5. Cultivo de células endoteliales comerciales no aorticas.....	68
4.7. Infección con partículas virales	68
4.7.1. Generación de partículas retrovirales por transfeccion.....	68
4.7.2. Inmortalización de las líneas celulares por infección partículas virales AgT	70
4.8. Delección del receptor de la insulina IR in vitro por el sistema de Cre-recombinasa	71
4.8.1. Delección del IR por el sistema Cre-recombinasa	71
4.8.2. Generación de líneas celulares por sobreexpresión de RecA y RecB por infección retroviral	72
4.9. Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación	73
4.9.1. Condición de Mantenimiento.....	73
4.9.2. Disolución de ácidos grasos	73
4.9.3. Condiciones de experimentación	74
4.10. Ensayos de muerte celular, supervivencia, proliferación y migración	74
4.10.1. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	74
4.10.2. Cristal violeta	75
4.10.3. Proliferación por recuento de celular e incorporación de BrdU	75
4.11. Análisis de la expresión genética	76
4.11.1. Aislamiento de RNA	76
4.11.2. qRT-PCR	77
4.12. Análisis de la expresión proteica.....	79
4.12.1. Obtención de proteínas	79
4.12.2. Western –blot y Electroforesis	80
4.12.3. Inmunoprecipitación	82
4.13. Técnicas de imagen.....	82
4.13.1. Inmunofluorescencia	82
4.13.2. La inmunohistoquímica	83
4.14. Otras técnicas	83
4.14.1. Marcaje de superficie celular por citometría de flujo.....	83
4.14.2. La medición de la captación de glucosa en las CMLV	84
4.14.3. Estadística: GraphPad Prism	84
4.14.4. Cuantificación de blots: Image J	84

5. RESULTADOS85

Parte I.....85

5.1. Papel de las isoformas del IR y del receptor de IGF-1 (IGF-1R) en la proliferación de las células de músculo liso vascular y en la aorta de modelos experimentales murinos con alteraciones vasculares85

5.1.2. Generación y caracterización de las líneas celulares..... 90

5.1.3. Señalización de la insulina y captación de glucosa en las células de músculo liso vascular..... 97

5.1.4. Papel de las isoformas del IR en la proliferación de las células de músculo liso vascular inducido por estímulo proaterogénicos..... 105

5.1.5. Asociación diferencial de las isoformas del IR con los receptores proaterogénicos en células de músculo liso vascular 110

5.1.6. La expresión de la isoforma IRA y TNF-R1 está aumentada en la aorta de ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO..... 128

5.1.7. Papel del IGF-2 y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en el inicio y desarrollo del proceso aterosclerótico 135

5.1.8. Expresión de IGF-1R y su asociación con IRA en los modelos experimentales de daño vascular..... 135

Parte II.....138

5.2. Papel de la UCP2 y el oleato en la protección en el daño vascular 138

5.2.1. Efecto diferencial del TNF- α y la insulina en la expresión de UCP-2 en las células vasculares 138

5.2.2. Papel protector de UCP-2 frente a la acumulación lipídica y el daño vascular 144

5.2.3. Relación entre la expresión de TNF- α y UCP-2 in vivo 157

5.2.4. Papel protector de UCP-2 frente al estrés oxidativo de la pared vascular 162

5.2.5. Papel del iNOS en la modulación negativa de UCP-2 inducida por TNF- α in vitro e in vivo 164

5.2.6. Efecto del Oleato sobre la expresión de UCP-2 in vitro 165

5.2.7. Efecto protector del oleato sobre la disminución de UCP-2 inducida por TNF- α 168

5.2.8. Efecto diferencial del oleato y el palmitato en la señalización de la insulina en las células cardiovasculares..... 169

5.2.9. Efecto protector del oleato en la función y activación endotelial y en la respuesta inflamatoria 171

5.2.10. Efecto protector del oleato en la viabilidad celular..... 190

5.2.11. Efecto protector del oleato en la proliferación de las células de músculo liso vascular 194

5.2.12. Efecto protector del oleato en la trombogénesis vascular 197

6. DISCUSIÓN.....	204
6.1. Implicación de la isoforma A del IR y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la proliferación de las células de músculo liso vascular: papel del TNF- α y del IGF-2	204
6.2. Efecto antagónico del TNF- α y la insulina en los niveles de expresión de UCP-2 y el daño vascular	209
6.3. Papel protector del ácido oleico frente a la inflamación y el daño inducido por el TNF- α y palmitato en las células cardiovasculares	212
7. CONCLUSIONES	218
7.1. Conclusiones en español	218
7.2. Conclusion in English	219
8. BIBLIOGRAFIA.....	220
9. ANEXOS	249
9.1. Publicaciones	250

1 RESUMEN SUMMARY

Pathophysiological significance of the insulin receptor isoforms in the atherosclerotic process. Protection mechanisms mediated by UCP-2 and oleic acid

Background: In recent years, the prevalence of obesity and metabolic syndrome, and its underlying the risk factors for develop cardiovascular disease (CVD); it has grown to become a worldwide public health problem. Metabolic syndrome links metabolic risk factors as dyslipidemias, hypertension, fasting hyperglycemia and abdominal obesity. Both, insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia, at the same time, increase the probability of develop hypertension and dyslipidaemia, increasing the risk of CVD. Therefore, hyperglycemia and insulin resistance appear to have a role in the development of macrovascular complications.

Objectives: To advance in our understanding of the insulin in atherosclerosis we consider first, studying the specific role of the insulin receptor isoforms and IGF-1R in this process, and secondly we consider looking for protective mechanisms against the vascular damage through UCP-2 and oleate.

Results: This study shows the importance of the insulin and its resistance at vascular level, and how it can influence the progression of atherosclerosis, both in vivo and in vitro. In the first part, we evaluated the role of the insulin receptor isoforms in the proliferation of vascular smooth muscle cells and the pathophysiological relevance of these in the atherosclerotic process. In the second part, we focus on the protection mechanisms against the atherosclerotic process mediated by UCP-2 and oleate.

Our data strongly suggest that the IRA iso-

form and the formation of hybrids with TNF-R1 receptor or with IGF-1R, but no IRB, confer a proliferative advantage to vascular smooth muscle cells mainly vitro and in vivo in response to TNF- α or IGF-2, which may be involved in the early stages of the atherosclerotic process.

Furthermore, our results suggest that insulin and TNF- α share an antagonistic effect on the UCP-2 expression levels in vascular cells and in aorta mice. Thus, a moderate hyperinsulinemia in response to insulin resistance or a decrease in TNF- α level in the aorta attenuates vascular damage, being an increase mediated UCP-2 through the reduction effect of iNOS. Therefore, an increase in the expression levels of UCP-2 could contribute, at least in part, to improved control of atherosclerotic process mainly in obese, diabetic or hypertensive patients having high levels of ROS.

Finally, we suggest oleate have their protective effects through inhibition of the activation of NF- κ B pathway, thereby improving insulin sensitivity, reducing the production of molecules involved in vascular dysfunction, and exercising control over the vascular cell viability, and the proliferation and apoptosis of VSMCs, and improve thrombogenesis, promoting fibrinolysis by reducing the production of PAI-1 and inhibit the decrease of UCP-2, preventing the progression of vascular injury.

Conclusion: This thesis has allowed, for the first time, to involve the insulin receptor A isoform in the growth of the atherosclerotic plaque. Moreover, it has established the protector mechanisms against the vascular damage which could be mediated by UCP-2, JNK-1/2 or NF- κ B. It also supports the beneficial effects at cardiovascular level of the oleic acid, the major lipid component of virgin olive oil, an essential element in the Mediterranean diet.

Importancia fisiopatológica de las isoformas del receptor de la insulina en el proceso aterosclerótico. Mecanismos de protección mediados por UCP-2 y el ácido oleico

Antecedentes: En los últimos años la prevalencia de la obesidad y el síndrome metabólico, y su subyacente riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (CVD), ha aumentado a nivel mundial convirtiéndose en un problema de salud pública. El síndrome metabólico interrelaciona factores de riesgo metabólicos que incluyen: la dislipidemia, la hipertensión, la hiperglucemia en ayunas y la obesidad abdominal. La combinación de resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria aumenta la probabilidad de hipertensión y una dislipidemia, aumentando el riesgo de CVD. Por lo tanto, la hiperglucemia y la resistencia a la acción de la insulina parecen tener un importante papel en el desarrollo de las complicaciones macrovasculares.

Objetivos: Para avanzar en el conocimiento de la insulina en el proceso aterosclerótico nos planteamos en primer lugar estudiar el papel concreto de las isoformas del receptor de la insulina y del IGF-1R en dicho proceso, y en segundo lugar nos planteamos buscar mecanismos protectores frente al daño vascular mediados por UCP-2 y el oleato.

Resultados: Este trabajo muestra la relevancia de la insulina y la resistencia a ésta a nivel vascular y como puede influir sobre la progresión de la aterosclerosis, tanto *in vivo* como *in vitro*. En una primera parte, evaluamos el papel de las isoformas del receptor de la insulina en la proliferación de las células de músculo liso vascular y la importancia fisiopatológica de éstas en el proceso aterosclerótico.

Nuestros datos sugieren fuertemente que la isoforma IRA y la formación de receptores híbridos con TNF-R1 o con IGF-1R, pero no IRB, confiere una ventaja proliferativa a las células de músculo liso vascular *in vitro* e *in vivo* principalmente en respuesta a TNF- α o IGF-2, que podría estar involucrado en las fases iniciales del proceso aterosclerótico.

Además, nuestros resultados sugieren que la insulina y el TNF- α comparten un efecto anta-

gonista sobre los niveles de expresión UCP-2 en las células vasculares y en la aorta de ratones *in vivo*. Así, una moderada hiperinsulinemia en respuesta a la resistencia a la insulina o un descenso de los niveles de TNF- α en la aorta atenúa el daño vascular, siendo un efecto mediado por el aumento de UCP-2 a través de la reducción de iNOS. Por lo tanto, un aumento de los niveles de la expresión de UCP-2 podría contribuir, al menos en parte, a un mejor control del proceso aterosclerótico principalmente en pacientes obesos, diabéticos o hipertensos que tienen niveles elevados de ROS.

Finalmente planteamos que el oleato media sus efectos protectores a través de la inhibición de la activación de la vía de NF- κ B, mejorando así la sensibilidad a la insulina, disminuyendo la producción de moléculas implicadas en la disfunción vascular, y ejerciendo un control sobre la viabilidad de las células vasculares, y la proliferación y apoptosis de las VSMCs, además de mejorar la trombogénesis, favoreciendo la fibrinólisis al reducir la producción de PAI-1 e inhibir la disminución de la UCP-2, impidiendo así la progresión del daño vascular.

Conclusión: Esta tesis ha permitido por primera vez implicar a la isoforma A del receptor de la insulina en el crecimiento de la placa aterosclerótica. Por otro lado, ha permitido establecer mecanismos de protección frente a ese daño que podrían estar mediados por UCP-2, JNK-1/-2 o NF- κ B. Apoyando además, los efectos beneficiosos a nivel cardiovascular del ácido oleico, como componente lipídico mayoritario del aceite de oliva virgen, principal en la dieta mediterránea.

2 INTRODUCCIÓN

2.1. Resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2

2.1.1. Diabetes y su fisiopatología

Existen dos tipos de diabetes que se diferencian principalmente por su etiología. La diabetes tipo 1 (DMT1) se da principalmente en la infancia, producida por una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas que resulta en una deficiencia absoluta de la insulina; este tipo representa alrededor de un 5-10% de todas las diabetes. La diabetes tipo 2 (DMT2) se caracteriza por un fallo en la acción de la insulina y/o su secreción, apareciendo normalmente en la población adulta. Es de carácter poligénico (>90% de todas las diabetes), siendo alrededor de un 1-2% de las diabetes monogénicas. Dentro de este grupo, también están incluidas la diabetes neonatal y las diabetes, denominadas MODY (maturity onset diabetes of the young). Alrededor de 15 genes diferentes han sido identificados e implicados como responsables de las diabetes monogénicas (Murphy et al. 2008).

La DMT2 es un trastorno metabólico de la homeostasis energética caracterizada por la hiperglucemia y alteración en el metabolismo de los lípidos causado por una incapacidad de las células β de los islotes para secretar insulina adecuada en respuesta a diversos grados de sobrealimentación y/o a la inactividad, asociado al sobrepeso u obesidad, y a la resistencia a la insulina (Nolan et al. 2011). El aumento de la prevalencia de la diabetes tipo 2 es un problema de salud pública de primer orden, puesto que incrementa el riesgo tanto de las complicaciones macrovasculares como la enfermedad cardíaca, infarto agudo de miocardio, ictus,... como de las complicaciones microvasculares como la ceguera, el fallo renal y las neuropatías periféricas, que reducen la calidad y la esperanza de vida. Las complicaciones causadas por la diabetes son una de las principales causas de consulta médica e ingreso hospitalario.

La insulina es la hormona anabólica por excelencia, que se encarga de estimular la captación de glucosa por parte de los tejidos periféricos, y a la vez impide que los lípidos del tejido adiposo sean liberados. Una falta de insulina, ya sea por una acción defectiva de la hormona (resistencia a la insulina), o por un defecto en la secreción por parte de las células β , lleva a múltiples alteraciones metabólicas. Éstas incluyen desde hiperglucemia, por falta de captación de glucosa, a la dislipidemia por la desregulación de la homeostasis lipídica, desencadenando el daño de múltiples órganos y la aparición de las denominadas, complicaciones diabéticas. Son varios los tejidos que tienen un papel clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la fisiopatología de la DMT2. Sin embargo, los tres órganos más importantes de acción de la insulina son el hígado, el músculo y el tejido adiposo, en consecuencia son los tres órganos más relevantes en la resistencia a la insulina.

La secreción de insulina desde el páncreas disminuye la producción de glucosa por parte del hígado, y mejora la captación de glucosa del músculo esquelético, suprimiendo la liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo. Una disminución en la secreción de insulina reduce la señalización de la insulina en sus tejidos diana. La disminución de la función de las células β pancreáticas parece estar implicada en la hiperglucemia crónica (glucotoxicidad), la exposición crónica a ácidos grasos no esterificados (lipotoxicidad), el estrés oxidativo y la inflamación. Los pacientes con DMT2 por lo general tienen disfunción de las células α del páncreas que resulta en un aumento de la secreción de glucagón en condiciones de hiperglucemia (Tahrani et al. 2011). El hígado es otro órgano clave para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Tras la ingesta, la insulina secretada por las células β pancreáticas, llega por circulación portal al hígado, donde debe actuar suprimiendo la producción hepática de la glucosa. En el caso de existir resistencia a la insulina en este órgano, la gluconeogénesis hepática estaría descontrolada, y contribuiría al desarrollo de hiperglucemia (Michael et al. 2000). El tejido adiposo blanco (WAT), que fisiológicamente sirve como depósito de lípidos, puede saturarse en situaciones de obesidad y provocar una redistribución anormal de los lípidos en otros tejidos. Además, el WAT produce adipocitoquinas (leptina, resistina, adiponectina, IL-6, TNF α), que juegan un importante papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina, que afecta a la acción de la insulina en los principales tejidos diana, conduciendo al aumento de la glucosa y los ácidos grasos circulantes, que a su vez empeoran tanto la secreción de insulina. La resistencia a la insulina desencadena la patología diabética y sus subsecuentes complicaciones (Figura 2.1)(Stumvoll et al. 2005; Tahrani et al. 2011).

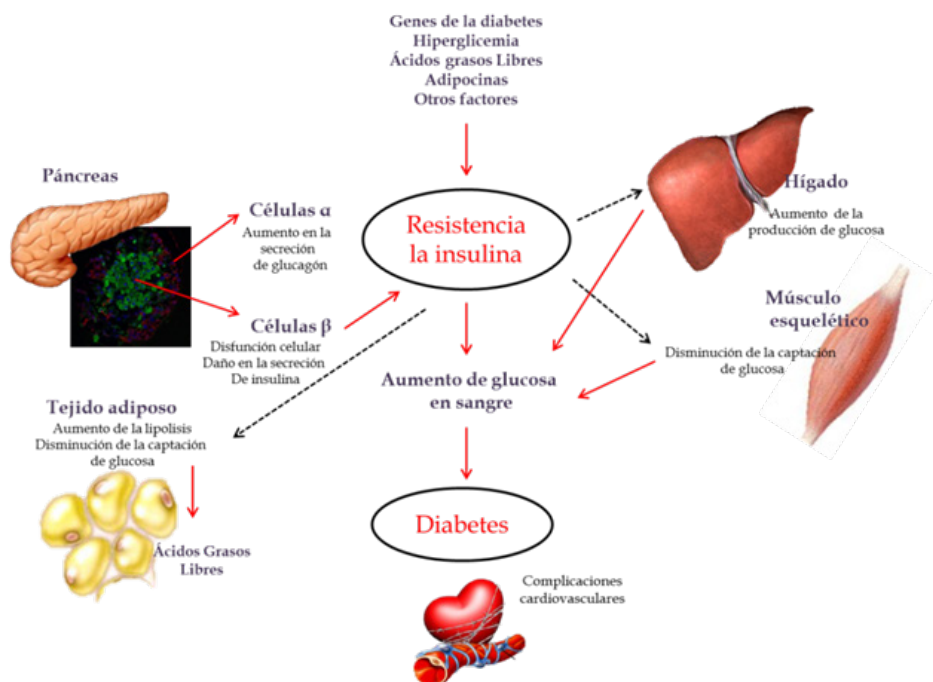


Figura 2.1. Fisiopatología de la diabetes tipo 2: órganos implicados en la progresión de la enfermedad. Una disminución de la secreción de insulina por el páncreas y/o una reducción de la señalización de la insulina en sus tejidos diana, puede aumentar la producción de glucosa por el hígado, disminuir la captación de glucosa por el músculo esquelético, y aumentar la liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo, causando el aumento de la glucosa y de los ácidos grasos circulantes, contribuyendo todo ello al desarrollo de la DMT2.

Aunque la resistencia a la insulina es importante en el desarrollo de la DMT2, no todos los individuos que presentan resistencia a la insulina acaban desarrollando la enfermedad. La fase de resistencia a la insulina, denominada pre-diabetes, puede alargarse durante años o incluso nunca evolucionar a diabetes. Tanto en modelos animales como en humanos, el evento clave es el fracaso de la célula β pancreática.

Inicialmente, hay un período "normal" de mínima resistencia a la insulina y sin necesidad de compensación de las células β . A medida que el grado de obesidad o la resistencia a la insulina aumenta se produce un período de "adaptación" en el que los niveles de glucosa en ayunas se mantienen mediante el aumento de los niveles de insulina (se inicia la hipertrofia e hiperplasia de las células β). Este periodo coincide con un aumento gradual de los ácidos grasos libres (FFA) circulantes. Esta fase es seguida por un período de "intolerancia a la glucosa" en el que los niveles de glucosa en ayunas son mantenidos por el aumento de la masa de células β y los niveles de insulina en ayunas, en un intento de compensar la resistencia a la insulina. Por último, se produce un fracaso de las células β , disminuyendo su masa y, en consecuencia, una hipoinsulinemia junto con una hiperglucemia en ayunas, produciendo el inicio de la diabetes tipo 2 (Figura 2.2) (Lingohr et al. 2002b).

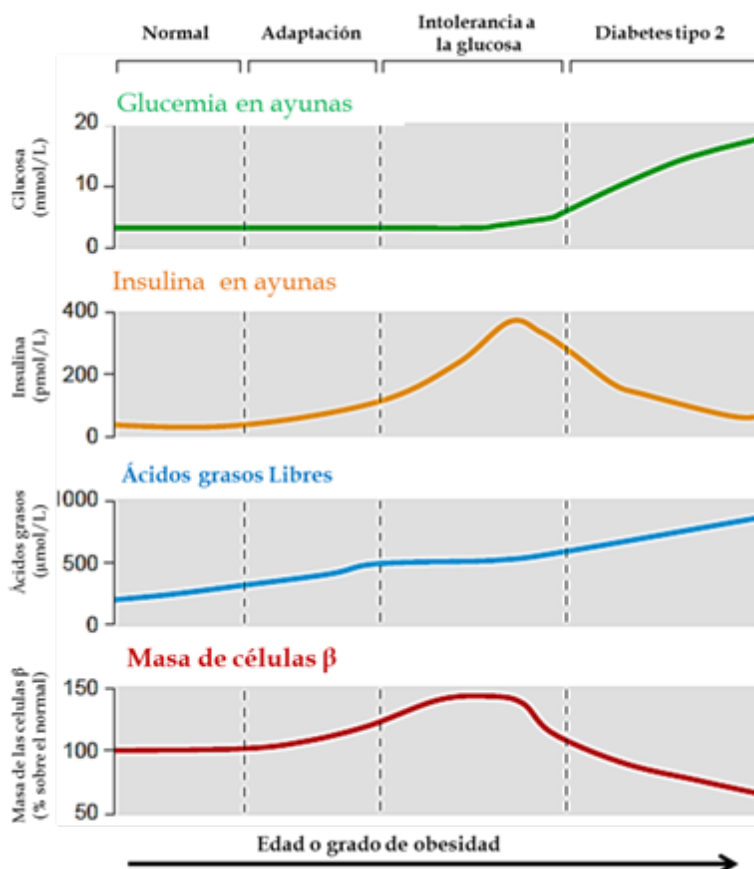


Figura 2.2. Progresión de la diabetes tipo 2. Evolución de los niveles de glucosa, de insulina y de ácidos grasos libres en sangre y la masa de célula β durante la progresión a la diabetes. El fracaso de la célula β representa el punto de inflexión, que conlleva a una disminución de la insulina circulante y a la manifestación de la diabetes. El marco de tiempo es variable dependiendo del grado de obesidad o del grado de resistencia a la insulina. Figura adaptada de (Lingohr et al. 2002a).

2.1.2. La insulina y las isoformas del receptor de la insulina

El páncreas es una glándula con una doble función, tanto endocrina como exocrina. La parte exocrina formada por los acinos serosos, secreta las enzimas digestivas. En la parte endocrina se encuentran los islotes de Langerhans que no representan más que el 1-2% del volumen total del páncreas. Los islotes contienen, al menos, cinco tipos de células secretoras de hormonas; las células α , que producen glucagón (15-20%); las células β , que producen insulina (65-85%); las células δ que producen somatostatina (3-10%); las células ϵ que producen grelina (<1%) y las células PP que producen el polipéptido pancreático (3-5%).

La función más importante de las células β pancreáticas es la secreción de insulina en respuesta al estado nutricional. La insulina es una hormona polipeptídica de 52 aminoácidos (Banting et al. 1922). Inicialmente, la insulina se sintetiza como preproinsulina, una única cadena de 110 aminoácidos. Por ruptura proteolítica se elimina el péptido señal amino-terminal, generando la proinsulina, de 86 aminoácidos. Posteriormente, la escisión de un fragmento interior de la proinsulina (péptido-C de 35 aminoácidos), genera la insulina, con dos cadenas (α y β), unidas por dos puentes disulfuro, y un tercer puente intracatenario en la cadena α (Figura 2.3).

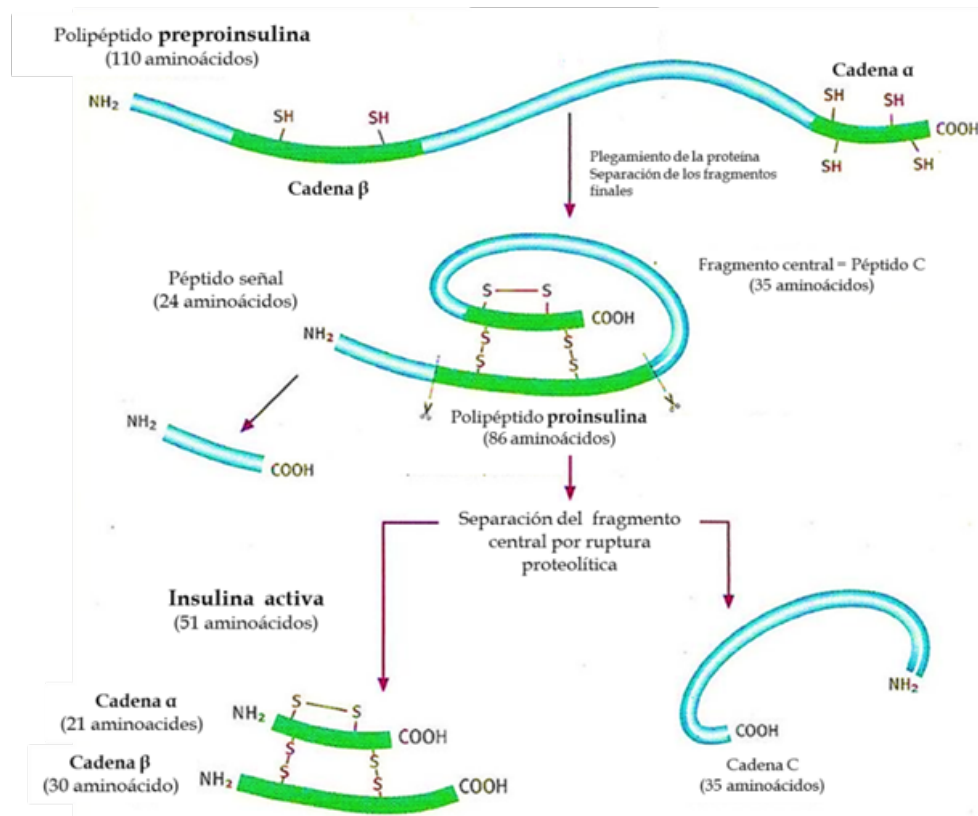


Figura 2.3. Síntesis de la insulina. Inicialmente la insulina se sintetiza como preproinsulina. Por ruptura proteolítica se genera la proinsulina y finalmente por la escisión de un fragmento interior se genera la insulina y el péptido-C.

El receptor de la insulina (IR) es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana, unidas por puentes disulfuro. De igual manera que las dos cadenas de su ligando, las del IR derivan de un mismo transcrito precursor, el pro-receptor, que se ensambla tras una rotura proteolítica. Tras la unión de la insulina al receptor, se produce un cambio conformacional que permite la unión del ATP y la autofosforilación en diferentes residuos de tirosina de la cadena β del IR (Kasuga, Karlsson, et al. 1982a), lo cual permite

la interacción del IR con sus sustratos intracelulares. En el IR también existen residuos de serina y treonina susceptibles de fosforilación y que regulan de forma negativa la actividad quinasa del IR. La estimulación crónica del receptor aumenta dichas fosforilaciones, disminuyendo su actividad (Kasuga, Zick, et al. 1982b).

El gen humano del IR contiene 22 exones, pero por procesamiento alternativo del mRNA, el exón 11 se traduce en la isoforma B (IRB), o aparece una forma sin exón 11 (IRA) (Sesti et al. 1994). Las dos isoformas únicamente difieren en 12 aminoácidos, que se encuentran cerca del extremo C-terminal de la cadena α del IRB (Seino & Bell 1989). La importancia fisiológica del procesamiento alternativo del exón 11 todavía no está clara. Lo que sí es claro es que ambas isoformas difieren ligeramente en su afinidad por la insulina; la isoforma B del pro-receptor, pero no la A, se une con alta afinidad a la insulina (de Meyts & Whittaker 2002). Curiosamente, la isoforma A tiene significativamente mayor afinidad por los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) que no tienen equivalente para el exón 11 (Belfiore et al. 2009)(Figura 2.4).

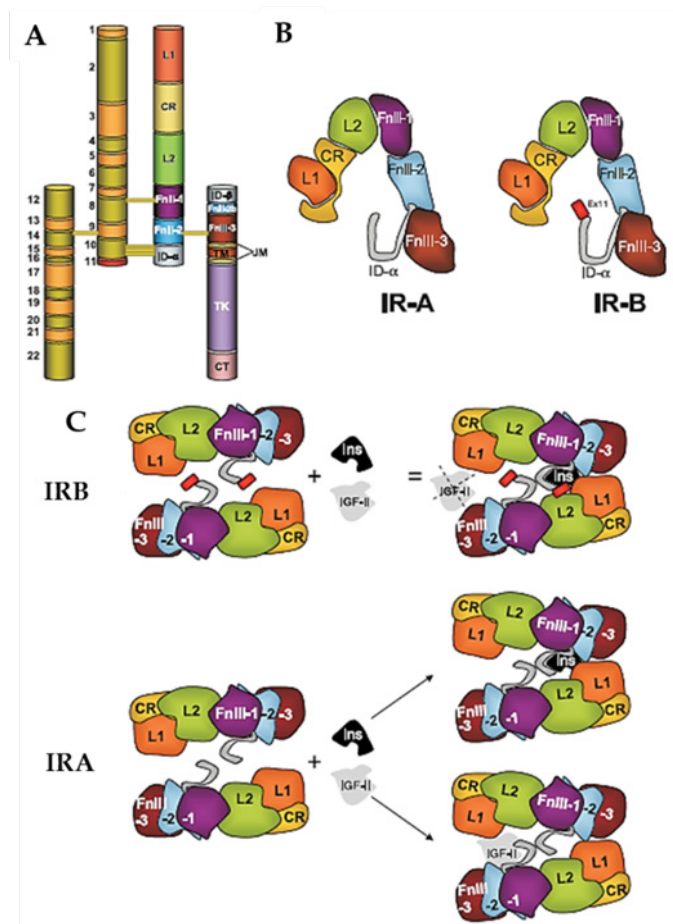


Figura 2.4. Estructura del receptor de insulina. A. Diagrama que muestra los límites de los 22 exones del gen del receptor de insulina. A. la izquierda, cadenas α : exones 1-11; cadenas β exones 12-22. A la derecha módulos predichos para cada exón: L1, dominio largo tipo 1; CR, dominio rico en cisteína; L2, dominio largo tipo2; Fn, 3 dominios tipo “fibronectina”; TM, dominio transmembrana; JM, dominio “juxta membranal”; TK, dominio tirosina-quinasa; CT, domino C-terminal B. Representación de la cadena α del IRA e IRB. ID- α , dominio inserto, + exón 11 (IRB); - exón 11 (IRA). C. Vista en planta del IR, siguiendo el eje de simetría. Se muestra la unión a la insulina y al IGF-2. Se representa un mayor impedimento en IRB por el exón 11 (en rojo). Esquema adaptado de (Belfiore et al. 2009).

Aún no se conoce con exactitud el papel de las diferentes isoformas del IR. Se sabe que la distribución de las isoformas varía según el tejido y el estadio del desarrollo, siendo el IRA característico del desarrollo fetal aunque también es expresado en tejidos adultos (Denley et al. 2003). En algunos trabajos, el IRA se ha relacionado con el cáncer o con la hiperplasia de las células β pancreáticas como mecanismo compensatorio frente a la resistencia a la insulina. En ambas situaciones patológicas, ese cambio de perfil de la expresión de las isoformas del IR, con un aumento de la expresión de IRA, confiere una ventaja proliferativa tanto a las células tumorales como a las células β pancreáticas. Por otro lado, no hay consenso sobre la afinidad relativa de las isoformas del IR por la insulina. Diferentes trabajos plantean una mayor afinidad del IRA por la insulina (Denley et al. 2004), en tanto que otros autores indican que es idéntica (Whittaker et al. 2002). Sin embargo, no existen discrepancias sobre la mayor afinidad del IRA por el IGF-2, versus IRB (Figura 2.4C), siendo esta afinidad mucho mayor que para el IGF-1 (Belfiore et al. 2009). La causa que lleva a la expresión de una u otra isoforma del IR es desconocida, aunque estudios en distrofia muscular, una patología relacionada con mayor expresión de isoforma IRA, han permitido identificar niveles elevados de la ribonucleoproteína nuclear heterogénea H (hn-RNP H) como responsable de la expresión preferencial de IRA en miocitos (Wang & Trayhurn 2006).

2.1.3. Señalización de la insulina

2.1.3.1. Sustratos del receptor de la insulina

Existen diversos sustratos del IR conocidos, los cuales también tienen un importante papel en la señalización a través del receptor del IGF-1 (Taniguchi et al. 2006). Los sustratos del IR mejor caracterizados son la familia de los “insulin receptor substrate” (IRS), que cuenta con 6 miembros que presentan alta homología, diferente función y distribución tisular. IRS-1 e IRS-2 se encuentran ampliamente distribuidos, siendo IRS-2 fundamental en la célula β y en el hígado. Sin embargo, en tejidos como el músculo esquelético y el tejido adiposo, los defectos en la señalización por el IRS-1 no se pueden compensar completamente por el IRS-2 (Sesti et al. 2001). IRS-3 se expresa en el tejido adiposo, el hígado, el pulmón, el riñón, el ovario, el corazón y los fibroblastos de murinos. IRS-3 está situado principalmente en la membrana plasmática y parece ser capaz de mediar señales mitogénicas. En tanto que IRS-4 se expresa en diversos tejidos humanos y líneas celulares, incluyendo el riñón, la hipófisis, la tiroides, el ovario, la próstata, fibroblastos, aunque no es muy abundante. Se cree que las respuestas biológicas al IGF-1, en ciertos tejidos, pueden ser moduladas por una combinación de las proteínas IRS (Sesti et al. 2001)(Figura 2.5).

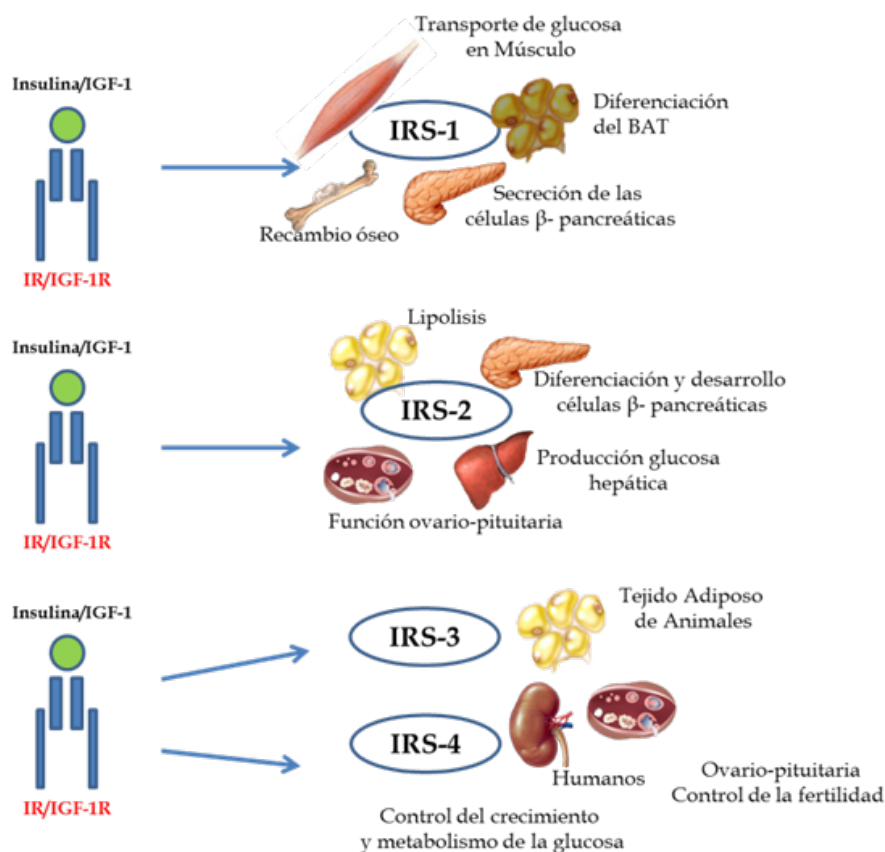


Figura 2.5. Esquema representativo de las diferentes funciones fisiológicas de los IRSs. La acción predominante del IRS-1 es la regulación del transporte de glucosa en el músculo, la diferenciación de los adipocitos marrones inducida por la insulina, la secreción de insulina por parte de las células β y un papel en el recambio óseo. IRS-2 parece jugar un papel crucial en la regulación del desarrollo y la diferenciación de la células β pancreáticas. IRS-2 tiene efecto sobre la lipólisis, la producción de glucosa hepática y la regulación del eje hipófisis-ovario. IRS-3 se encuentra principalmente en el tejido adiposo de animales, mientras que IRS-4 está presente principalmente en riñón humano y tiene efecto sobre la regulación del eje hipófisis-ovario. Figura adaptada de (Sesti et al. 2001).

Las proteínas IRS contienen múltiples residuos susceptibles de ser fosforilados. Los residuos de tirosina (21 residuos en IRS-1 de los cuales se conservan 14 en IRS-2), al fosforilarse, sirven como puntos de anclaje para proteínas con dominios “Src homology 2” (SH2). Muchas de estas proteínas actúan como moléculas adaptadoras, tal como la subunidad reguladora de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), o “growth factor receptor-bound protein 2” (Grb2). La fosforilación en tirosina del IR y del IRS está contrarregulada por las tirosín-fosfatasas. En estados de resistencia a la insulina, estas fosfatasas se encuentran reguladas positivamente. La tirosín-fosfatasa más estudiada es la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) (McCole 2013). Además de en tirosina, los IRS pueden fosforilarse en serina/treonina (unos 30 residuos) por diversas quinasas, entre las cuales se encuentra la quinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K)(Heijnen et al. 2014). La fosforilación en serina/treonina es causa de resistencia a la acción de la insulina y a los IGFs. La fosforilación de estos residuos es un mecanismo de contrarregulación de la señalización de la insulina, que se activa por un estímulo prolongado, además de servir de comunicación con otras vías de señalización que la regulan negativamente (TNF α , JNK, IKK β , etc.) (Hotamisligil et al. 1996).

Tanto IRS-1 como IRS-2 se expresa en las células vasculares (Begum 2003). Se ha descrito que una regulación a la baja de IRS-1/IRS-2 aumenta la proliferación de las células de músculo liso vascular (VSMCs) vía ERK-MAPKs. En particular se ha descrito que el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la endotelina-1 (ET-1), la angiotensina II (Ang II) y la aldosterona pueden desregular IRS-1 y/o IRS-2. Los efectos de esta desregulación dependen de la ruta de señalización activada en la VSMCs: vía ERKs tal desregulación se ha asociado a patologías vasculares (Zhao et al. 2011) y vía IRS-1/PI3K/AKT conduce a la alteración de los efectos vasodilatadores de la insulina, por disminución de la producción de óxido nítrico (NO) (Li Q. et al. 2013b).

2.1.3.2. Ruta PI3K

PI3K funciona como un nodo crítico de la señalización de la insulina, formado por una subunidad reguladora y una catalítica. La interacción entre el dominio SH2 de la subunidad reguladora de PI3K y los dominios de IRS fosforilados en tirosina produce la activación de la subunidad catalítica de PI3K (Myers et al. 1992). PI3K fosforila al fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para formar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (Kaneko et al. 2010). La acción de PI3K puede ser negativamente regulada por fosfatasas de PIP3, PTEN (phosphatase and tensin homolog; 3'-fosfatasa de PIP3) y SHIP2 (SH2-containing PIP3 phosphatase 2; 5'-fosfatasa). Modelos animales carentes de estas proteínas presentan mayor sensibilidad a la insulina y resistencia a la obesidad inducida por dieta grasa (Sleeman et al. 2005).

PIP3 actúa como segundo mensajero, y permite el anclaje en membrana plasmática y la activación de proteínas con dominios de pleckstrina (PH), como la quinasa dependiente de fosfoinositida 1 (PDK1). La activación de PDK1 por PIP3 lleva a la fosforilación de AKT en Thr308 y de PKC ζ en Thr410. AKT es una serina/treonina quinasa, que presenta tres isoformas (AKT1, AKT2, AKT3) con diferente distribución tisular. A nivel sistémico, AKT media muchas de las acciones esenciales de la insulina para la homeostasis metabólica (transporte de glucosa mediado por GLUT-4 en tejidos periféricos, síntesis de glucógeno, disminución de la gluconeogénesis hepática, etc.). El mecanismo que lleva a la fosforilación de AKT no está del todo claro (Gupta et al. 2013), pero se conoce que para completar su activación es necesario la fosforilación del residuo de Ser 473; y esta fosforilación no es mediada por PDK1 sino por mTORC2 (Sarbasov & Sabatini 2005). En humanos se han identificado varias mutaciones genéticas que podrían producir resistencia a la insulina severa (Henning et al. 2014), como las mutaciones en AKT2 (George et al. 2004).

2.1.3.3. Ruta Ras-MAPK

La ruta Ras-MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) es activada por la insulina tras la unión a los dominios fosforilados en tirosina del IR y del IRS, los cuales a su vez, se unen a las proteínas fosforiladas Grb2 y SOS. Esto causa la activación del dominio GTPasa de Ras, y la subsiguiente activación de Raf, que desencadena una cascada de señalización que resulta en la fosforilación de MEK1/2 y ERK1/2 (Pouyssegur et al. 2002). Las ERKs fosforilan múltiples proteínas, entre ellas TSC2 y la quinasa de la proteína ribosomal S6 p90 (RSK) (Ma et al. 2005). Estas acciones llevan a un aumento de la síntesis proteica general y la expresión de ciertos genes. Diversas evidencias indican que las ERK1/2 son efectoras de las acciones mediadas por insulina en el crecimiento y la diferenciación, pero no tanto para sus acciones metabólicas. La estimulación de ERK en hígado, es capaz de promover señales nerviosas, por medio de un eje

hepato-neuro-pancreático, que llevan a un aumento de la masa de las células β pancreáticas en condiciones de resistencia a la insulina (Imai et al. 2008). Previamente, nuestro laboratorio demostró como la glucosa es capaz de activar a ERK de manera independiente de la insulina secretada por las células β IR^{-/-} (Guillén et al. 2006). Otro estudio demostró que la señalización de glucosa, in vitro, a través de la ruta Ras-MAPK, tiene consecuencias únicamente a nivel de la proliferación celular, y no sobre la función secretora de las células β (Minami & Seino 2013).

2.1.3.4. Señalización vascular de la insulina

En las células vasculares, la insulina se une a su receptor desencadenando su fosforilación y activación. La fosforilación de los residuos de tirosina del IRS, inducen la activación de dos vías de señalización en paralelo: la vía PI3K/AKT y la ruta de Ras/Raf/MAPK (Steinberg & Baron 2002; Isenović et al. 2010). Clásicamente, la señalización metabólica de la insulina induce la vasodilatación del músculo liso, a través de un aumento del NO por las células endoteliales, vía PI3K. Sin embargo, la insulina, a nivel vascular, promueve la vasoconstricción y la proliferación principalmente a través de la vía MAPKs. Se ha descrito que ambos mecanismos están implicados en la patogénesis de la diabetes y la resistencia a la insulina (Muniyappa & Sowers 2013).

IRS-1 activa PI3K y produciendo PIP3, que promueve la fosforilación y la activación de AKT, que a su vez fosforila el residuo de serina 1177 de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés). La eNOS cataliza la conversión de L-arginina y O₂ a L-citrulina y NO (Rajapakse et al. 2013). Es importante destacar que la vía PI3K/AKT no es la única vía que puede modular la activación de eNOS, por ejemplo un suministro inadecuado de tetrahidrobiopterina, cofactor de eNOS, limita su actividad enzimática (Manrique et al. 2014) (Figura 2.6).

El NO producido por la eNOS reduce la proliferación de las VSMCs, disminuyendo la adherencia de las células inflamatorias y la agregación plaquetaria en el endotelio. La insulina además de modular la producción de prostaglandinas y de factores derivados del endotelio, puede promover vasoconstricción y el crecimiento de las VSMCs, por el aumento de la producción ET-1, vía MAPKs. ET-1 es producido en el endotelio, puede aumentar el estrés oxidativo y promover el crecimiento celular de las VSMCs (Manrique et al. 2014). El aumento de los niveles de ET-1 y la disminución de NO en paralelo contribuyen a una función vascular anormal (Muniyappa & Sowers 2013).

Se ha demostrado que, aunque la respuesta a IGF-1 es menor que la respuesta a la insulina en las células endoteliales HUVEC, estas células tienen un mayor número de IGF-1Rs que IRs. En este tipo celular, la insulina puede activar IGF-1R y activar la secreción de NO a través de mecanismos alternativos. Sin embargo, la producción de NO puede ser limitada porque la insulina se une con una menor afinidad al receptor de IGF-1 que al IR (Zeng & Quon 1996; Higashi et al. 2012). La insulina también promueve la fosforilación de la treonina 495 de la eNOS en las células endoteliales (ECs). La desfosforilación de este residuo es aumentado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Potenza et al. 2009). Las alteraciones como la disfunción endotelial y otros estados que favorecen la resistencia a la insulina como hipertensión y la insuficiencia cardíaca, se caracterizan por alteraciones de la producción de NO (Rajapakse et al. 2013).

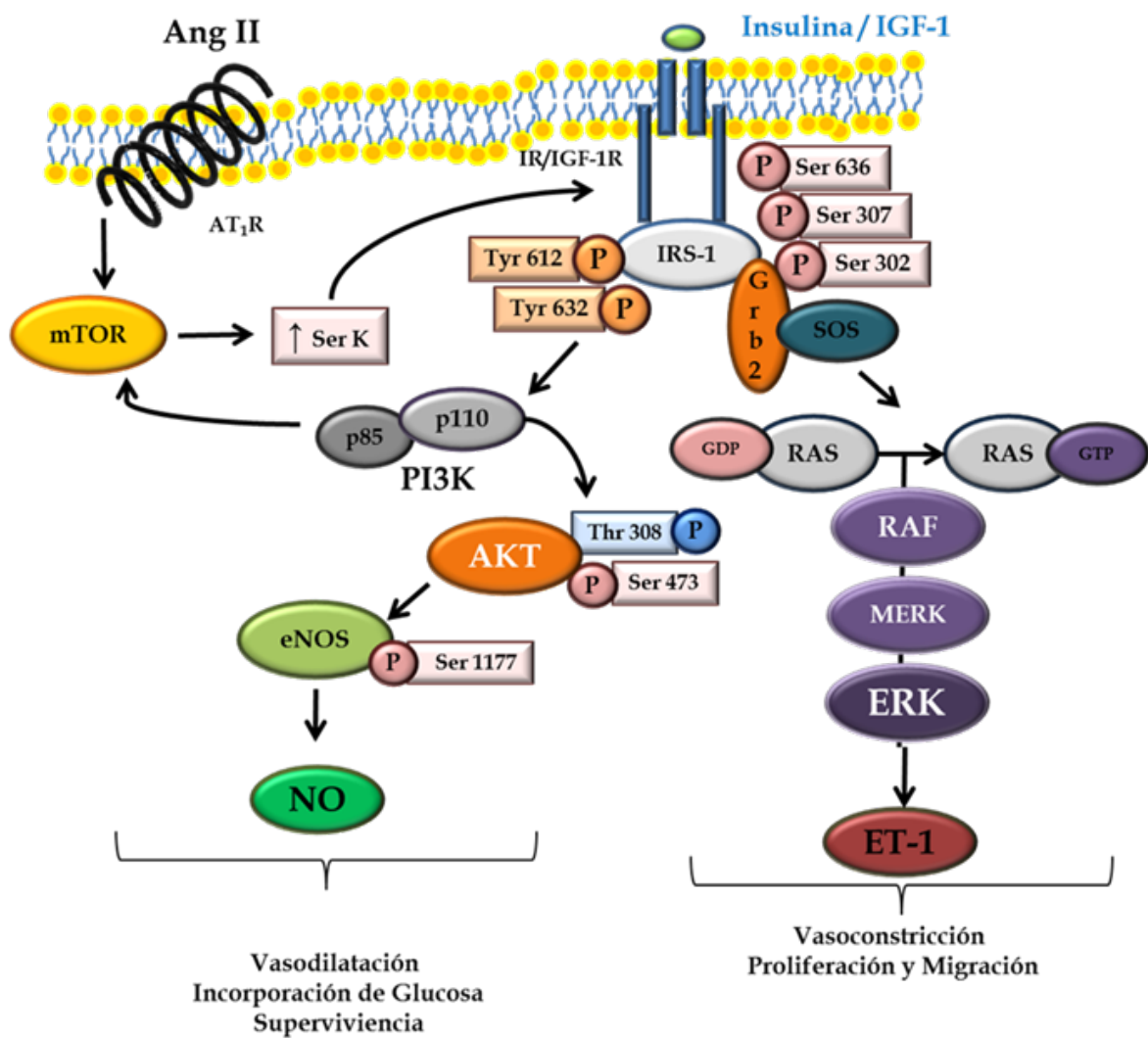


Figura 2.6. Esquema de la señalización de la insulina en las células vasculares. La señalización de la insulina en las ECs y las VSMCs se produce después de la unión de la insulina a su receptor. Esto hace que la activación de dos vías separadas y paralelas. La vía PI3K-AKT, induce un resultado en el aumento de la producción de NO y la vasodilatación del músculo liso por la activación de eNOS (fosforilación del residuo de Ser1177) en las células endoteliales. Y la vía Ras/Raf/MAPK, que induce la producción de ET-1 en las células endoteliales, favoreciendo la vasoconstricción y la proliferación y migración del músculo liso (Manrique et al. 2014).

2.1.4. El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y de su receptor (IGF-1R)

Los factores de crecimiento similares a la insulina o IGFs (IGF-1 e IGF-2), son polipéptidos con homología estructural a la proinsulina e insulina que habitualmente circulan en el plasma sanguíneo unidos a proteínas de alta afinidad fijadoras de IGFs (IGFBP) (Delafontaine et al. 2004). El IGF-1 regula procesos de proliferación y diferenciación en múltiples tipos celulares y son capaces de ejercer los efectos metabólicos característicos de la insulina, pero, a diferencia de ésta, son sintetizados por la mayoría de tejidos del organismo (Vigneri et al. 2010). Por otro

lado, el IGF-2 es un factor de crecimiento primario requerido para el desarrollo temprano y fetal de órganos como el cerebro, hígado y riñón (Hughes et al. 2014). Los IGFs ejercen sus efectos fisiológicos mediante la unión al receptor de IGF-1 (IGF-1R) y a los receptores híbridos u holoreceptores (IR/IGF-1R), que constan de un subunidad (A o B) del receptor de la insulina y otra subunidad (A o B) del receptor de IGF-1 (Higashi et al. 2012) (Figura 2.7).

En las VSMCs, ambas subunidades de IGF-1 y del receptor de insulina se expresan, pero la expresión de las primeras es mayor que la de las segundas, lo que resulta en la expresión predominante de receptores IGF-1R y receptores IR/IGF-1R (Higashi et al. 2012). IGF1-R organizado en holoreceptores con el IR, conduce a una mayor señalización de la insulina y pone en manifiesto las propiedades antiinflamatorias de la insulina en las VSMCs (Engberding et al. 2009). En las ECs, se expresan tanto las subunidades del receptor de insulina como las del IGF-1R y, aunque la expresión del IGF-1R es más abundante que la del receptor de insulina (Zeng & Quon 1996). Por lo tanto, ECs expresan IGF-1R, receptor híbrido IR/IGF-1R y receptor de insulina. Sin embargo, las ECs parecen más sensibles a la insulina que las VSMCs. De hecho, la insulina a concentraciones fisiológicas activa al receptor de insulina, pero no al de IGF-1 o híbridos receptores (Higashi et al. 2012).

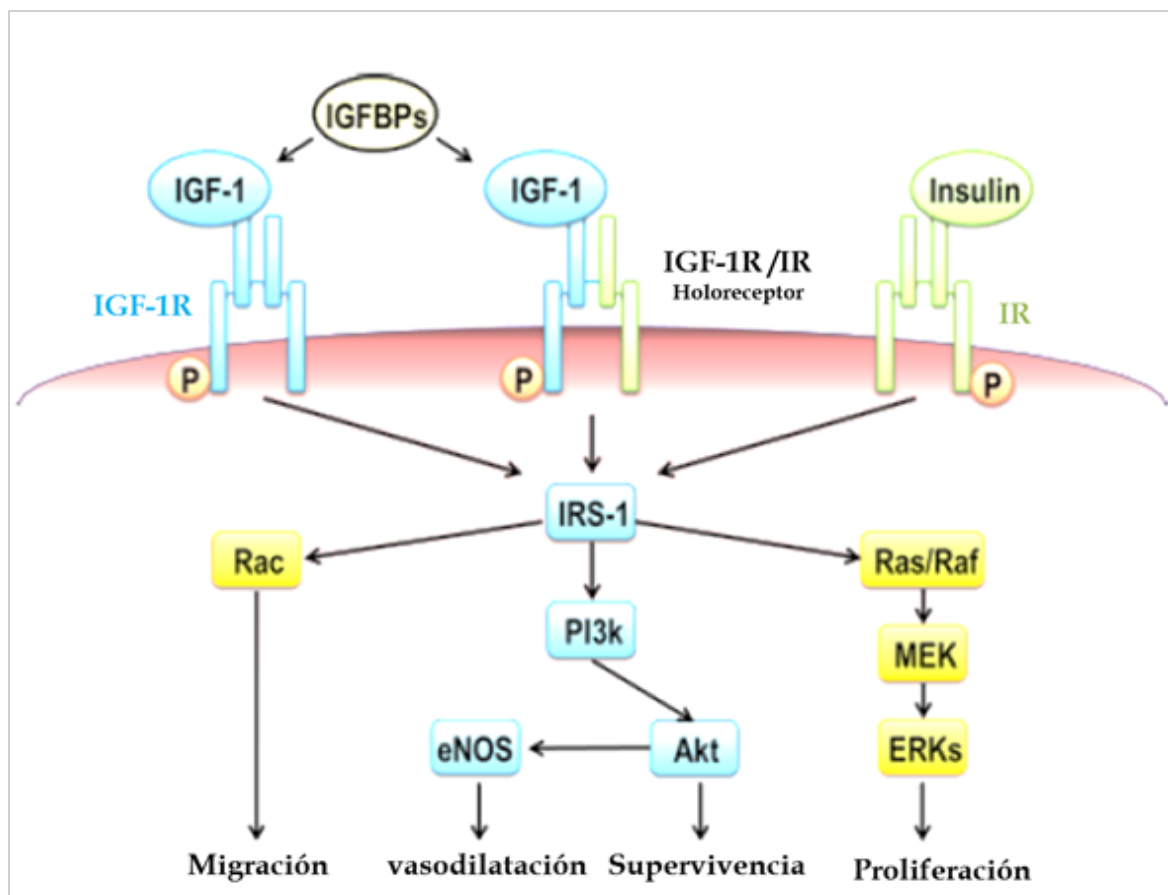


Figura 2.7. Transducción del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) en células vasculares. IGF-1 se une al IGF-1R y al receptor híbrido IGF-1R/IR, mientras que la insulina se une sólo a su receptor desencadenando varias vías de señalización. La activación de la vía activada, los IGFs y la insulina conduce a la supervivencia celular y mejora la actividad del enzima óxido nítrico sintasa, induciendo de este modo la vasodilatación, o a través de la Vía Ras/Raf/ERK favorece la proliferación y la migración celular (Higashi et al. 2012).

IGF-1 es un potente mitógeno y un factor antiapoptótico para las VSMCs y las ECs, pero al mismo tiempo induce la migración de VSMCs. En la literatura se ha planteado que IGF-1 podría ser proaterogénico, a través de su capacidad para estimular la migración y la proliferación de VSMCs. Además, IGF-1 mejora la quimiotaxis de macrófagos, y promueve la expresión de moléculas de adhesión (Guolian L et al 2009), e induce la inhibición de la apoptosis (Griendling & FitzGerald 2003). Sin embargo, también se ha postulado que una reducción del IGF-1 y sus efectos de supervivencia podrían ser perjudiciales en la desestabilización de placas ateroscleróticas (Thüsen et al. 2011).

2.1.4. Modelos de resistencia a la insulina

A lo largo de los años se han generado distintos modelos de ratones modificados genéticamente con objeto de estudiar las complicaciones metabólicas de la resistencia a la insulina. La regulación del metabolismo glucídico mediado por la insulina en los tejidos periféricos como el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético, se produce a través de la ruta de señalización IRS-1/PI3K/AKT, por lo cual el receptor de la insulina juega un papel muy importante. Inicialmente fue generado un ratón carente del IR en todo el organismo, pero estos animales fallecieron a los pocos días de nacer, debido a una severa cetoacidosis (Joshi et al. 1996). Los ratones con ausencia del IRS-1 presentaron un moderado retraso del crecimiento y una moderada intolerancia a la glucosa (Tamemoto et al. 1994). Sin embargo, el ratón carente de IRS-2 presentó una severa intolerancia a la glucosa y un defecto en la secreción de insulina debido a una hipoplasia en las células β pancreáticas (Previs et al. 2000). En tanto que, el modelo doble heterocigoto para IR/IRS-1+/- (Brüning et al. 1997b), presentó resistencia a la insulina y aproximadamente un 50% de los ratones desarrollaron diabetes; este fenotipo se agravó en el triple heterocigoto IR/IRS-1/IRS-2+/- (Kido et al. 2000).

2.1.5. Modelos animales carentes del IR de forma específica de tejido (IRKO)

La inactivación de un gen utilizando la tecnología estándar de recombinación homóloga produce una pérdida de funcionalidad del gen en todas las células del organismo. Sin embargo, mediante la tecnología loxP-Cre, se pueden generar modelos murinos carentes de un determinado gen en un tejido específico o en unas determinadas células, siempre y cuando se encuentre un promotor específico de ese tejido que permita expresar la recombinasa únicamente en el lugar de interés. Utilizando la tecnología LoxP-Cre se han desarrollado modelos carentes del IR en varios tejidos (Tabla 2.1).

El ratón con delección del IR específicamente en el músculo esquelético (MIRKO) presentó un bloqueo severo de la acción de la insulina, pero no se llegaba a desarrollar diabetes. Sin embargo, el modelo MIRKO tenía alteraciones metabólicas como el aumento de los depósitos de grasa e hipertrigliceridemia, características del cuadro de síndrome metabólico (Brüning et al. 1997a). El modelo carente del IR en la célula β (β IRKO) presentó defecto en la secreción de la insulina, causando una progresiva intolerancia a la glucosa y diabetes (Kulkarni et al. 2002). El modelo CIRKO mostró un menor tamaño de cardiomiocitos y un metabolismo alterado, con un aumento de las tasas de asimilación de glucosa y de la glucólisis, y un descenso de la oxidación de ácidos grasos (Belke et al. 2002). En el hígado se generaron dos modelos; uno con delección del

IR constitutiva (LIRKOc) y otro inducible (LIRKOi). En el modelo LIRKOc presentó resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y un fallo en la supresión de la producción hepática de glucosa; el perfil se revertió a los cuatro meses (Michael et al. 2000). Sin embargo, en el LIRKOi presentó hiperinsulinemia con un aumento de la masa de célula β pancreática, y un fallo de la secreción de insulina que condujo a una diabetes (Escribano et al. 2009). El modelo VENIRKO que se generó para estudiar la implicación de la insulina en la función endotelial, presentó una homeostasis de la glucosa y una vasculatura normal, con alteraciones en la regulación de la presión sanguínea y en la expresión de ET-1 y eNOS (Vicent et al. 2003). El modelo VENIRKO/ApoE-/- se generó para estudiar el papel de la resistencia a la insulina en el endotelio en el proceso aterosclerótico, poniéndose en evidencia que la presencia de resistencia a la insulina vascular acelera la aterosclerosis (Rask-Madsen et al. 2010).

Genotipo	Fenotipo	Referencia
Constitutivo	Diabético, cetoacidosis, letal	Accili et al., 1996 Joshi et al., 1996
Músculo esquelético (MIRKO)	Discreta intolerancia a la glucosa y adiposidad	Bruning et al. 1997
Músculo/tejido adiposo	Intolerancia a la glucosa	Lauro et al. 1998
Célula beta (β IRKO)	Hipoplasia de células β , Inhibición de la secreción de insulina intolerancia a la glucosa	Kulkarni et al. 1999 SNC
(NIRKO)	Obesidad Infertilidad	Bruning et al. 2000
Tejido adiposo marrón (BATIRKO)	Defecto en la secreción de insulina Diabetes	Guerra et al. 2001
Músculo cardíaco (CIRKO)	Reducción del tamaño y funcionalidad del corazón.	Belke et al. 2002
Adipocito	Resistencia a la obesidad Longevidad	Bluher et al. 2002; Bluher et al. 2003
Endotelio vascular (VENIRKO)	Reactividad vascular alterada Desarrollo de retinopatías	Vicent et al. 2003
Hígado (LIRKOc) (LIRKOi)	Resistencia a la insulina Hiperglucemia transitoria Progresión a diabetes tipo 2	Michael et al. 2000 Escribano et al. 2009

Tabla 2.1. Modelos murinos carentes del receptor de insulina de forma específica de tejido (IRKO).

2.1.6. Modelo BATIRKO

Uno de los modelos carentes del IR de forma tejido-específica, fue en el tejido adiposo marrón (BAT) que recibió el nombre de BATIRKO y se generó en nuestro laboratorio en el año 2001 (Guerra et al. 2001). Este ratón se obtuvo usando la tecnología loxP–Cre, de manera que el exón 4 del IR estaba flanqueado por las secuencias loxP. La recombinasa Cre se encontraba bajo el promotor de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), que es específica del tejido adiposo marrón. De manera que la inactivación del IR se producía exclusivamente en dicho tejido adiposo marrón (BAT). Estos ratones presentaron lipoatrofia marrón severa e intolerancia a la glucosa dependiente de la edad sin resistencia a la insulina. Este hecho se debía a un defecto en la secreción de la insulina. Este modelo experimental sugería dos aspectos desconocidos hasta la fecha, que no sólo la insulina y su receptor eran claves en la adipogénesis del tejido adiposo marrón sino que ponía de manifiesto el papel del tejido adiposo en la regulación de la secreción de la insulina y la homeostasis glucídica (Guerra et al. 2001). Años más tarde, nuestro grupo también demostró que la pérdida del receptor de la insulina específicamente en el BAT que conduce a una lipoatrofia marrón severa confería susceptibilidad a desarrollar obesidad, caracterizada por un aumento significativo de la adiposidad visceral y un estado inflamatorio que podría contribuir al desarrollo de alteraciones metabólicas y vasculares descritas (Gómez-Hernández et al. 2014). Estos resultados demostrados en este modelo experimental se han descrito tener su relevancia en humanos, en especial asociados al envejecimiento, describiéndose la relación inversa de la masa del tejido adiposo marrón con el índice de masa corporal y el papel del mismo en el control del metabolismo glucídico (Cypess et al. 2009).

2.2. Obesidad

2.2.4. La obesidad en la actualidad

La obesidad es una enfermedad inflamatoria crónica de tipo multifactorial con un incremento en países desarrollados en las últimas décadas, convirtiéndose en una epidemia actual y un problema de salud pública, asociado a números problemas (Cascio et al. 2012; Gibbons et al. 2014). En la obesidad existe un desbalance crónico entre las calorías consumidas y las gastadas, por lo que la acumulación de TAG por parte de los adipocitos aumenta. El aumento de peso corporal en la obesidad produce efectos sobre la presión arterial, el colesterol, los triglicéridos y la sensibilidad a la insulina (Eckel et al. 2011). El aumento de la circunferencia de la cintura, conlleva un aumento progresivo de los niveles de glucosa en ayunas que pueden desencadenar una DM2, aumento del riesgo de enfermedad coronaria y de accidente cerebrovascular isquémico (Félix-Redondo et al. 2013; Katrina et al. 2014).

2.2.5. La obesidad y la resistencia a la insulina

El incremento de los lípidos genera una disfunción celular que altera el balance de la secreción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, con un aumento de las primeras y una disminución de las segundas, que pueden afectar las células y los tejidos de todo el cuerpo (Gnanińska et al. 2010).

Sin embargo, las células no adiposas, que constituyen la fracción del estroma vascular, como los preadipocitos, las ECs, los fibroblastos, los leucocitos y los macrófagos, llevan a cabo un importante papel en la respuesta inflamatoria crónica existente en la obesidad (Gustafson et al. 2009).

Durante la cronicidad de la obesidad, se produce estrés celular y activación de las vías de JNK y vías de NF- κ B (Baker et al. 2011),(Katrina et al. 2014); estas vías de señalización regulan la fosforilación de proteínas y diferentes eventos transcripcionales que conducen a un aumento en la producción de moléculas pro-inflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-6, leptina y resistina, quimioquinas tales como proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP- 1), y otros mediadores proaterogénicos, tales como PAI-1 (Sengenès et al. 2007). Moléculas de adhesión endoteliales (ICAM-1 y VCAM-1), y moléculas quimioatrayentes (CCX), se unen a las integrinas y receptores de quimiocinas (CCR), respectivamente, y favorecen el reclutamiento de monocitos y otras células inflamatorias en el tejido adiposo (Bourlier et al. 2008). Los monocitos internalizados se diferencian a macrófagos y amplifican la respuesta inflamatoria que produce muchas de las mismas citoquinas inflamatorias y diferentes quimioquinas descritas anteriormente (Zernecke & Weber 2014; Chawla et al. 2011).

El aumento de la adiposidad también activa la respuesta inflamatoria en el hígado a través de la vena porta, produciendo la activación del factor NF- κ B en los hepatocitos grasos y un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α , la IL-6 y la IL-1 β (Di Massimo et al. 2006), generando así una inflamación sistémica que produce resistencia a la insulina en el músculo esquelético y otros tejidos periféricos. En el tejido vascular, la resistencia a la insulina podría ayudar a iniciar el proceso aterogénico (Romeo et al. 2012). Además, del reclutamiento de células inflamatorias, otros tipos de células podrían participar en la respuesta hasta llegar a la vascularización de los depósitos grasos (Navarro et al. 2014).

Se ha demostrado que en los sujetos obesos presentan un aumento del TNF- α sérico y en el tejido adiposo (Olszanecka-Glinianowicz et al. 2004). En contraste, la pérdida de peso en obesos disminuye los niveles séricos de TNF- α (Dandona et al. 1998). Por lo cual se ha propuesto que el TNF- α podría ser uno de los nexos de unión entre la obesidad y la resistencia a la insulina (Wieser et al. 2013). Otro mecanismo descrito entre la obesidad y la resistencia a la insulina es la alteración de la homeostasis de la glucosa a través de la inhibición de la translocación de GLUT-4, mediante la activación de quinasas pro-inflamatorias y de estrés, y proteínas tirosina fosfatasa, como la PTP1B que reduce la fosforilación en tirosina del receptor de insulina (IR) y los sustratos del receptor de insulina (IRSs) (Alonso-Chamorro et al. 2011). En adipocitos se ha demostrado que el TNF- α inhibe la captación de glucosa dependiente de insulina afectando a la cascada de señalización de la insulina a nivel del IRS-1, mediante un mecanismo dependiente de JNK1/2 (Pérez et al. 2013).

En los mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo marrón (BAT) que tienen diferente morfología, distribución, expresión génica y función. WAT es el principal reservorio de energía y segrega un gran número de hormonas y citoquinas que regulan el metabolismo y la resistencia a la insulina (Rosen & Spiegelman 2006). El desarrollo de la obesidad no sólo depende del equilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético, sino también el equilibrio entre el tejido adiposo blanco, como el depósito de energía principal, y el tejido adiposo marrón, especializado en el gasto de energía a través de la termogénesis sin tiriteo a través de la proteína de desacoplamiento mitocondrial 1 (UCP-1) (Almind et al. 2007).

2.2.6. El tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco (WAT) se compone de los adipocitos blancos que se mantienen unidos por un tejido conjuntivo poco vascularizado. El adipocito blanco contiene pocas mitocondrias, con un núcleo de ubicación periférica y el citoplasma contiene una sola gota grande de lípidos que ocupa 90% del volumen (Mattson 2010). Adicionalmente, este tejido contiene macrófagos, leucocitos, fibroblastos, células progenitoras y ECs.

Clásicamente se ha considerado al WAT como depósito de energía y su exportación de la misma a otros tejidos. Además, es un órgano de secreción de moléculas de acción endocrina, paracrina y autocrina (Frühbeck et al. 2001), el cual parece tener un papel en la resistencia a la insulina y otras complicaciones vasculares asociadas con la obesidad (Gastaldelli et al. 2002). Las moléculas secretadas por el tejido adiposo blanco están relacionadas en procesos como la regulación del peso corporal (leptina, adiponectina), la inflamación local generada en la obesidad (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), la función vascular (Ang II y PAI -1) y otros procesos biológicos.

En los seres humanos, existen dos depósitos principales de tejido adiposo blanco: depósito subcutáneo, correspondiente al tejido adiposo que se encuentra debajo de la piel, y el depósito visceral, el cual envuelve a los diferentes órganos. Existen numerosas diferencias moleculares, celulares y anatómicas entre el tejido adiposo subcutáneo y el visceral. La obesidad periférica se caracteriza por una acumulación de tejido adiposo subcutáneo y es más frecuente en mujeres. Sin embargo, la obesidad central u obesidad abdominal es más común en hombres y consiste en una acumulación de tejido adiposo visceral. Este tipo de obesidad se ha asociado, a través de estudios epidemiológicos, con un mayor riesgo de enfermedades tales como la diabetes tipo II y la hipertensión, incrementando en gran medida el riesgo cardiovascular (Murabito et al. 2013).

2.2.7. El tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón (BAT) se compone de adipocitos marrones, que tienen forma poligonal, un núcleo oval y centrado en un gran citoplasma que cuenta con un gran número de mitocondrias y pequeñas gotas de lípidos. Además, está altamente vascularizado e innervado. Además, el BAT contiene la proteína UCP-1 (Mattson 2010). El BAT genera algunas adipoquinas como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF21), implicado en la adaptación al frío y la estimulación adrenérgica, actualmente considerado como una diana para el tratamiento de la obesidad (Emanuelli et al. 2014). Otros factores que secreta son la IL-6, el factor de neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el angiotensinógeno y el óxido nítrico (Chartoumpekis et al. 2011).

El BAT está mayoritariamente presente en los seres humanos durante el período neonatal. Sin embargo, en los adultos se conservan algunos depósitos metabólicamente activos (en la zona cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal, para-aortical y regiones suprarrenales en humanos), que responden al frío y a la activación del sistema nervioso simpático (Gilsanz et al. 2012). Además, el BAT podría tener un papel principal en el metabolismo lipídico y de hidratos de carbono (Bartelt et al. 2011). BAT podría estar implicado en el aclaramiento de los triglicéridos y el aumento del gasto energético, por un aumento del metabolismo oxidativo, que permitiría mejorar los efectos perjudiciales de la obesidad como la resistencia a la insulina o el proceso aterogénico (Ouellet et al. 2012).

La activación del tejido adiposo marrón en ratones, reduce la adiposidad visceral y la protege de la inducida por la dieta alta en grasas (Guerra et al. 2001). Por lo tanto, la pérdida de masa del BAT como en la lipoatrofia marrón severa inducida por la delección del receptor de insulina o la pérdida de UCP-1 confieren susceptibilidad a la obesidad (Gómez-Hernández, A. et al. 2012). Se ha descrito que la cantidad de BAT se correlaciona inversamente con el índice de masa corporal en los seres humanos, sobre todo en personas de edad avanzada (Cypess et al. 2009).

En los últimos años se ha descrito un tipo de adipocitos que comparte características con los adipocitos marrones dentro de depósitos de WAT, aunque no derivan del linaje *myf5*, conocidos como "beige" o "células brillantes" (Ishibashi & Seale 2010). Estas células son positivas para UCP-1, con alta capacidad respiratoria, con características del tejido adiposo blanco y el marrón (Wu et al. 2012). Adipocitos blancos y beige provienen de dos poblaciones distintas de los precursores de los linajes Pax7- Myf5-negativos, en tanto que los adipocitos marrones provienen del linaje Pax7 -Myf5-positivo. Estas células Myf5 positivos se diferencian en adipocitos marrones a través de la acción de los reguladores transcripcionales de PRDM16, PPARs, y/o C/EBP-β. El adipocito marrón inducible o beige, poseen muchas de las características bioquímicas y morfológicas del marrón, incluyendo la presencia de gotitas de lípidos multiloculares y la expresión de UCP-1 (Gilsanz et al. 2012) (Figura 2.8).

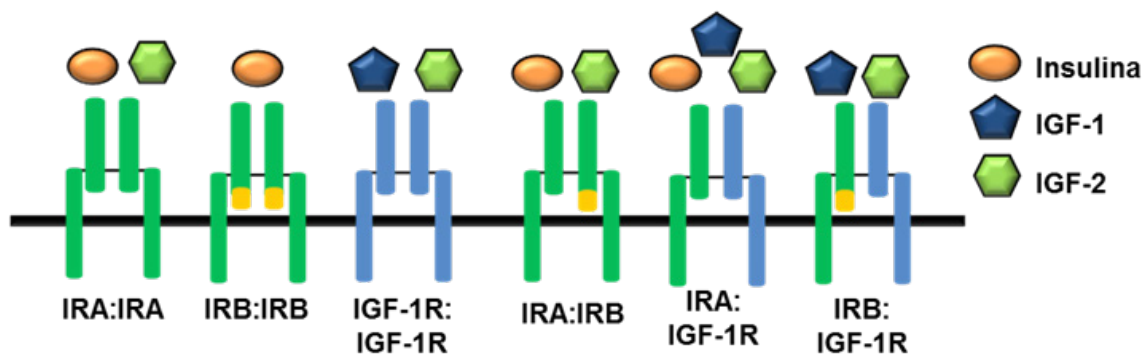


Figura 2.8. IGF-1R y los receptores híbridos IR/IGF-1R.

2.2.8. El tejido adiposo perivascular

El tejido adiposo perivascular (PVAT), está situado alrededor de la arteria coronaria (o tejido adiposo epicárdico), de la aorta (tejido adiposo periaórtico) y de otros vasos sistémicos, así como de la base de la microcirculación del tejido mesentérico (Meijer et al. 2011). Dependiendo del lecho vascular, el PVAT puede tener más o menos características de tejido adiposo blanco o marrón. Se ha descrito que el PVAT de la arteria abdominal sería esencialmente el tejido adiposo blanco, en arterias coronarias humanas tendría un fenotipo intermedio entre el tejido adiposo marrón y blanco, y en la arteria aorta torácica sería muy similar al BAT (Police et al. 2009).

Funcionalmente, se ha descrito que el PVAT podría tener un papel en el aclaramiento de lípidos y el mantenimiento de la temperatura intravascular tras exposición al frío. Además de la producción de adipocitoquinas proinflamatorias, el PVAT ejerce su acción en la regulación del tono vascular en condiciones fisiológicas y en la remodelación vascular en condiciones fisiopatológicas. Las células inflamatorias presentes en el PVAT están implicadas en el reclutamiento y/o la

proliferación de miofibroblastos y contribuyen a la remodelación vascular (Takaoka et al. 2010). Además, el PVAT secreta grandes cantidades de factores angiogénicos que inducen el crecimiento celular endotelial y la liberación de citoquinas a partir de células de músculo liso (Rittig et al. 2008), esta función se pierde en estados de obesidad (Meijer et al. 2011). Asimismo, existe una correlación positiva entre el aumento de PVAT y la cantidad de tejido adiposo intra-abdominal (Meijer et al. 2011). También, se ha descrito que en patologías como la obesidad y la aterosclerosis, el PVAT, pueden favorecer el infiltrado de macrófagos y linfocitos T (Fitzgibbons et al. 2011) y, la producción de leptina (Takaoka et al. 2010), citoquinas proinflamatorias y quimioquinas (Marchesi et al. 2009), especies reactivas del oxígeno (ROS) (Meijer et al. 2011; Sacks & Fain 2011) y así como de ácidos grasos esterificados (Mazurek et al. 2003).

2.3. Aterosclerosis

La aterosclerosis es la primera causa de morbimortalidad cardiovascular en el mundo occidental. Se define como una respuesta inflamatoria a una lesión del endotelio vascular (Ross 1993), de evolución multifactorial y que presenta una lesión típica conocida como placa de ateroma. Esta lesión se desarrolla en la pared de los vasos a lo largo de los años. Está formada por un depósito lipídico recubierto de tejido conectivo, distintos tipos celulares como las VSMCs y componentes de la sangre (monocitos /macrófagos, linfocitos T y plaquetas) (Sary 1994). El desarrollo de la lesión se debe a una respuesta inflamatoria del endotelio que consta de la disfunción endotelial y formación de la estría grasa, la progresión de la lesión y la rotura de la placa y trombosis (Sansbury & Hill 2014; Bentzon et al. 2014). La formación del trombo que puede dar lugar a accidentes vasculares en corazón, cerebro o extremidades (Fuster et al. 1992).

2.3.4. Estructura y función de los vasos sanguíneos: tipos de células

La pared de los vasos sanguíneos está compuesta por tres capas: la túnica íntima (capa delgada interna), la túnica media (capa gruesa intermedia), y la túnica adventicia (capa superficial). La túnica íntima comprende una monocapa de ECs sustentada por tejido conectivo. La túnica media, separada de la íntima por la lámina elástica interna, consiste en VSMCs dispuestas helicoidalmente y embebidas en una matriz de fibras de colágeno, elastina y proteoglicanos. La lámina elástica externa separa la túnica media de la adventicia, que soporta fibroblastos y nervios. En la arterosclerosis, el daño endotelial induce la pérdida del control por parte de las células endoteliales de la proliferación y de migración de las VSMCs, y la producción de matriz extracelular, cambiando éstas de fenotipo contráctil a sintético.

2.3.5. Inicio y desarrollo del proceso aterosclerótico

Se considera aterosclerosis como una respuesta inflamatoria a una lesión del endotelio vascular provocada por estímulos de diversa índole (Ross 1993), como la disfunción endotelial, que a su vez desencadena una serie de eventos como la adhesión y la infiltración celular de monocitos y alteración de la capacidad antitrombótica, fibrinolítica y vasomotora. En condiciones normales, las ECs captan lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes y las transportan hacia el espacio subendotelial donde se unen a proteoglicanos (Penn et al. 1994); cuando el tiempo de residencia de estas LDL en el espacio subendotelial aumenta, se incrementa la probabilidad de oxidación de éstas al entrar en contacto con los radicales libres liberados por las células ECs, macrófagos y VSMCs (Steinberg 1997). Estas LDL oxidadas (LDLox) pueden activar el endotelio (Rangaswamy et al. 1997), estimular la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de factores quimiotácticos, como la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1) (Cushing et al. 1990), incrementando la adhesión y migración de las células circulantes y de las VSMCs hacia la íntima.

Los monocitos se activan y se diferencian a macrófagos que expresan receptores de la LDL modificada (también llamados scavenger). Este receptor reconoce a las LDLox y provoca la fagocitosis por parte del macrófago que hidroliza y reesterifica el colesterol, almacenándolo en gotas lipídicas y transformándose en células espumosas (Quinn et al. 1987). El acúmulo de estas células ricas en contenido lipídico, con un leve engrosamiento de la íntima cubierto de endotelio intacto, constituye la estría grasa. Además, la hiperlipidemia prolongada o la propia inflamación, conduce a una agresión mayor del endotelio, favoreciendo la liberación de factores mitogénicos, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), que estimula la proliferación y migración de las VSMCs desde la capa media hasta la íntima, dando lugar al engrosamiento de la neoíntima (Bentzon et al. 2014). Finalmente, las células espumosas estallarán, liberando todo su contenido intracelular al espacio extracelular. Esto dará lugar a la formación del núcleo lipídico, que será recubierto por matriz extracelular rica en colágeno y por VSMCs (Figura 2.9).

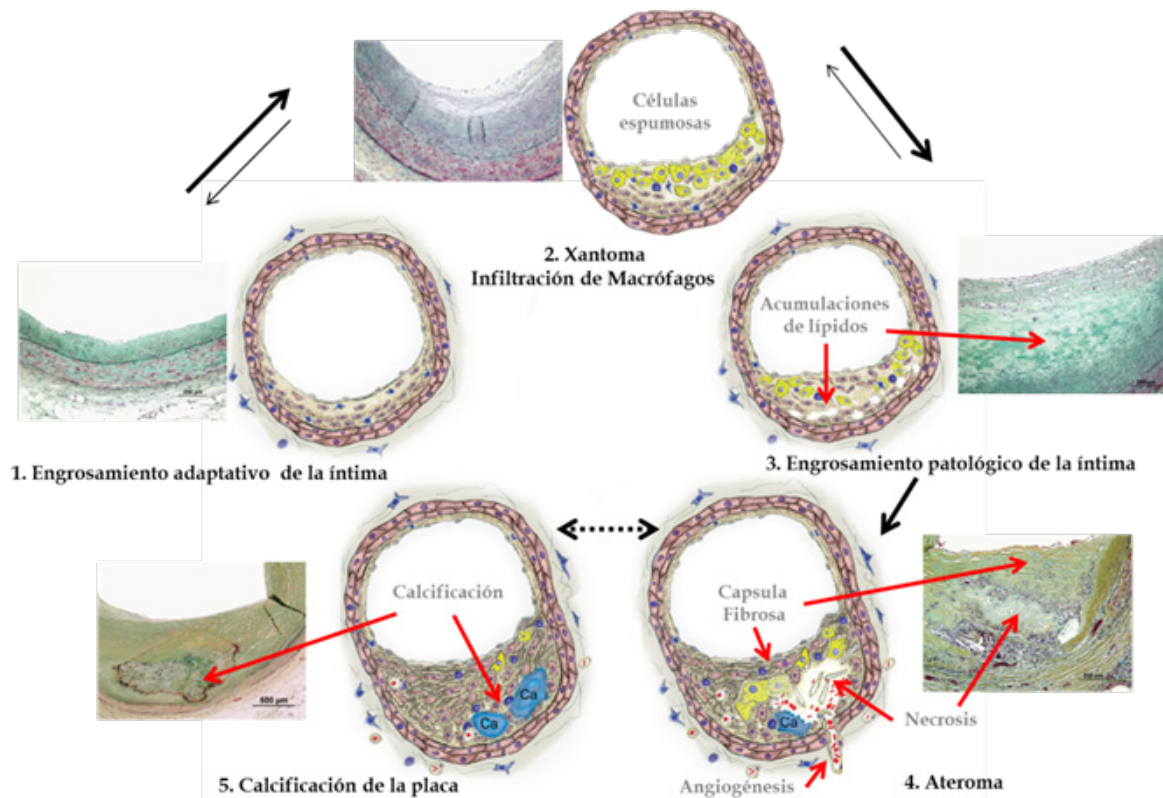


Figura 2.9. Esquema de la formación y progresión de la placa aterosclerótica. Se puede observar cómo se forma la placa aterosclerótica, caracterizada por un núcleo necrótico recubierto de una capa fibrosa que contiene macrófagos y lípidos. A medida que progresa la lesión, observamos varios procesos: 1) engrosamiento adaptativo de la íntima por acumulación de las VSMCs; 2) xantoma e infiltración de macrófagos y formación de células espumosas; 3) engrosamiento patológico de la íntima acumulación de plaquetas y otras células del sistema inmune; 4) ateroma, y 5) calcificación de la placa (Sansbury & Hill 2014; Bentzon et al. 2014).

2.3.6. Ruptura de la placa de ateroma y trombosis

La rotura de la placa de ateroma puede deberse a distintos procesos como la apoptosis de las VSMCs (Isner et al. 1995), que genera un debilitamiento de la cápsula y puede provocar unas fisuras de la placa, y/o por la síntesis de metaloproteasas por parte de las VSMCs y los macrófagos, que degradan la matriz extracelular, provocando una menor consistencia de la lesión. Sin embargo, el proceso inmunoinflamatorio en la placa aterosclerótica se considera también otro mecanismo decisivo que conduce a la desestabilización, rotura y subsiguiente formación de un trombo, que es la base de las consecuencias clínicas más graves de la aterosclerosis (Bentzon et al. 2014).

Una vez que se produce la fisura de la placa, se exponen a la circulación sanguínea los componentes del núcleo lipídico (mayoritariamente lípidos, microcalcificaciones y detritus celulares que incluyen macrófagos y VSMC activados) (Toschi et al. 1997), condicionan la formación local de trombina, la activación de plaquetas y la formación de fibrina (Golledge & Siew 2008). Los monocitos-macrófagos presentes en la lesión sintetizan agentes procoagulantes (factor tis-

lar o el factor XIIIa), factores relacionados con la fibrinólisis como el activador del plasminógeno semejante a la uroquinasa (u-PA), activador tisular del plasminógeno (t-PA) o inhibidores del activador del plasminógeno (PAI), así como radicales libres o proteasas.

Tras la ruptura de la placa, existen tres posibles evoluciones dependiendo de la labilidad del trombo y de la capacidad de la fibrinólisis local; 1) organización del trombo con crecimiento progresivo de la placa; 2) oclusiones intermitentes que producen isquemias transitorias, y 3) oclusión completa con necrosis de la zona afectada (Bentzon et al. 2014). Una vez formado el trombo, los monocitos liberarán el factor tisular que a su vez induce la formación de trombina. Dicha proteína es un potente activador de las plaquetas. Posteriormente, las VSMCs activadas penetran en el trombo, comenzando a sintetizar colágeno. La hipercolesterolemia está asociada con un estado de hipercoagulabilidad y con un aumento de la reactividad de las plaquetas en la zona de la lesión vascular (Badimon et al. 2013). Las LDLox inhiben la actividad de la NO sintasa, promoviendo la formación de trombos, debido a que aumentan la unión al fibrinógeno (Chen et al. 1996) (Figura 2.10).

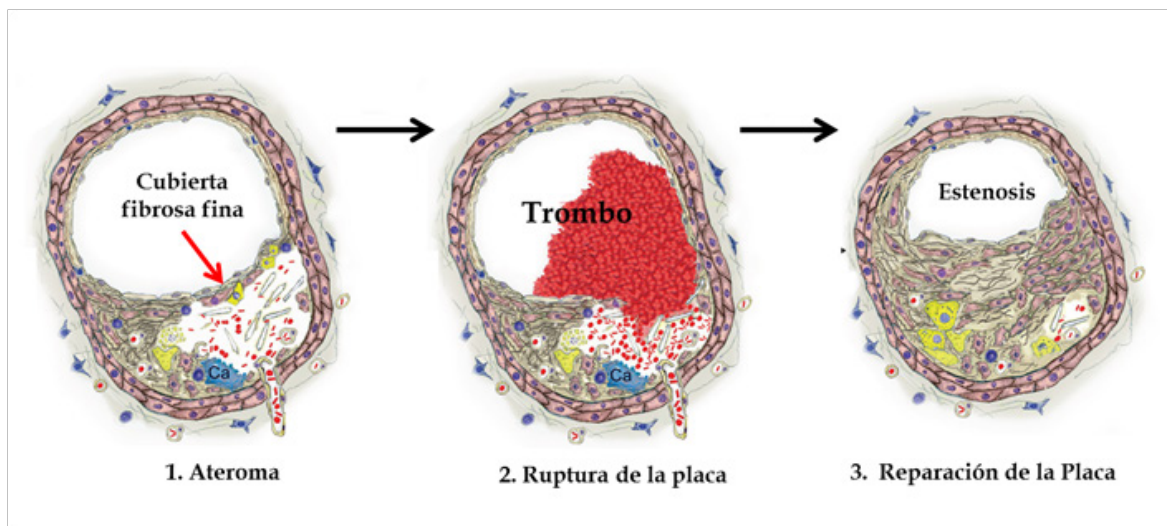


Figura 2.10. Ruptura y reparación de la placa de ateroma. La ruptura de la placa se produce por un adelgazamiento de la capa fibrosa y un aumento del infiltrado de células espumosas (macrófagos); debido a: 1) la pérdida gradual de las VSMCs de la capa fibrosa y al aumento de colágeno en la cápsula. Al mismo tiempo, los macrófagos infiltrantes degradan la matriz rica en colágeno y se secretan enzimas proteolíticas tales como activadores del plasminógeno, catepsinas, y metaloproteinasas; 2) las metaloproteinasas activas degradan todos los componentes de la matriz extracelular, generando la ruptura, llevando a la formación del trombo que tapona la luz del vaso, impidiendo el paso del flujo de sangre y produciendo isquemia en el tejido afectado; y 3) la reparación de la placa produce estenosis del vaso que puede conllevar necrosis del área (Bentzon et al. 2014).

2.3.7. Modelos animales de aterosclerosis y daño vascular

Con el objetivo de mejorar la comprensión del daño vascular y la inducción de las lesiones ateroscleróticas, a lo largo de los últimos años se han generado varios modelos animales de aterosclerosis, en ratones, conejos, cerdos y primates no humanos. Sin embargo, cada uno de los modelos animales actuales presenta alguna limitación. (Kapourchali et al. 2014). Uno de los modelos mu-

rinos más ampliamente estudiado es el que presenta la delección de la apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), debido a la hipercolesterolemia y al desarrollo de la aterosclerosis de manera espontánea, resultando lesiones muy similares a las humanas (Zhang et al. 1992). También, se utiliza para investigar el impacto del estrés oxidativo y la inflamación en la aterogénesis (Barry-Lane et al. 2001). Los ratones con delección en el receptor para las lipoproteínas de baja densidad (LDLR^{-/-}) son un modelo similar a la de la hipercolesterolemia familiar humana (Sanan et al. 1998). Sin embargo, a diferencia de los ratones ApoE^{-/-}, los ratones LDL-R-KO no desarrollan aterosclerosis espontánea, y es necesario administrales una dieta rica en grasas. Otros modelos que han sido generados, son: ratones con delección de la lipasa hepática (Homanics et al. 1995), ratones transgénicos para la ApoB100 humana (Greeve et al. 1993), ratones transgénicos para la proteína de transferencia del colesterol-éster humano (CETP) (Föger et al. 1999), modelo quirúrgico de los ratones ApoE^{-/-} (Lewis et al. 2007; Chen et al. 2013) y el modelo animal desarrollado utilizando la técnica de la médula ósea (Ishibashi et al. 2004) (Tabla 2.2).

Genotipo	Fenotipo	Referencia
Ratón Apo E ^{-/-}	Aterosclerosis espontánea Niveles elevados de VLDL circulantes	(Zhang et al. 1992)
Ratón deficiente del receptor LDL	Aterosclerosis asociada con niveles elevados de LDL y VLDL circulantes únicamente bajo dieta rica en CH	(Sanan et al. 1998)
Ratón transgénico Apo E*3-Leiden	Hipercolesterolemia y aterosclerosis asociada a los niveles de CH circulantes únicamente bajo dieta rica en CH.	(van Vlijmen et al. 1998; Groot et al. 1996)
Ratón con delección de la lipasa hepática	Niveles elevados de colesterol en plasma, fosfolípidos, y HDL	(Homanics et al. 1995)
Ratón transgénico para Apo B100 humana	Aumento importante niveles de LDL	(Greeve et al. 1993)
Ratón transgénico para la proteína de transferencia del colesterol -éster humano	Disminución de los niveles de HDL Presentó cierto grado de disminución de aterosclerosis	(Föger et al. 1999)
Modelo quirúrgico de Apo E ^{-/-}	Un modelo para el estudio de la inestabilidad y ruptura de la placa arteriosclerótica	(Chen et al. 2013; Lewis et al. 2007)
El modelo animal de técnica de la médula ósea	Apo E ^{-/-} con y sin deficiencia del CCR2	(Ishibashi et al. 2004)

Tabla 2.2. Modelos murinos de daño vascular

2.3.8. Moléculas implicadas en la disfunción vascular

2.3.8.1. El óxido nítrico

El NO es una pequeña molécula gaseosa que actúa como mediador en numerosos procesos biológicos. Se produce a partir del grupo guanidinio de la L-arginina, siendo el otro producto de la reacción la L-citrulina. Esta reacción está catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que es una oxidorreductasa (ya que tiene un dominio oxidasa y un dominio reductasa) responsable de la síntesis de óxido nítrico. Existen tres isoformas en el hombre: la NOS neuronal (nNOS o NOS1), la NOS inducible (iNOS o NOS2), y la NOS endotelial (eNOS o NOS3) (Dellamea et al. 2014). Las enzimas constitutivas generan pequeñas cantidades de NO, sin embargo la actividad de la iNOS se produce con una mayor capacidad (Förstermann & Kleinert 1995). Algunos estudios también sugieren una isoforma NOS localizada en las mitocondrias, sin embargo, su función específica aún no está clara (Finocchietto et al. 2009; Gupta & Kaiser 2010).

La isoforma eNOS está sujeta a diversas modificaciones posteriores a la traducción, que proveen mecanismos de regulación para la estimulación y la inhibición enzimática en respuesta a estímulos fisiológicos y fisiopatológicos. La actividad de eNOS está controlada por el complejo Ca²⁺/calmodulina intracelular, disminuyendo la actividad de éstas en presencia de quelantes de calcio (Moncada et al. 1990) y antagonistas de la calmodulina (Busse & Mülsch 1990). En su forma quiescente eNOS se encuentra anclada a las caveolas por miristoilación y palmitoilación, y se inhibe por unión la caveolina vinculante (Cav 1), mediante la fosforilación inhibidora en la serina 116. El desplazamiento de la unión por el calcio-calmodulina caveolina, por la acción de agentes quelantes de calcio, favorece la desfosforilación de la Ser 116 y la denitrosilación en las Cys 96 y 101, estimulando así, la fosforilación en la Ser 1177, que mejoran la actividad enzimática, junto con su unión a hsp90. Después de la estimulación prolongada con el agonista, la eNOS se depalmitoila y se transloca desde la zona periférica de la membrana a la parte interna. La eNOS se inactiva por la disociación de la calmodulina uniéndose nuevamente a la caveolina, acompañada de re-nitrosilación de la enzima y desfosforilación del residuo en Ser 1177 y la subsecuente fosforilación del residuo en Ser 116 (figura 2.11) (Dudzinki & Michel 2007).

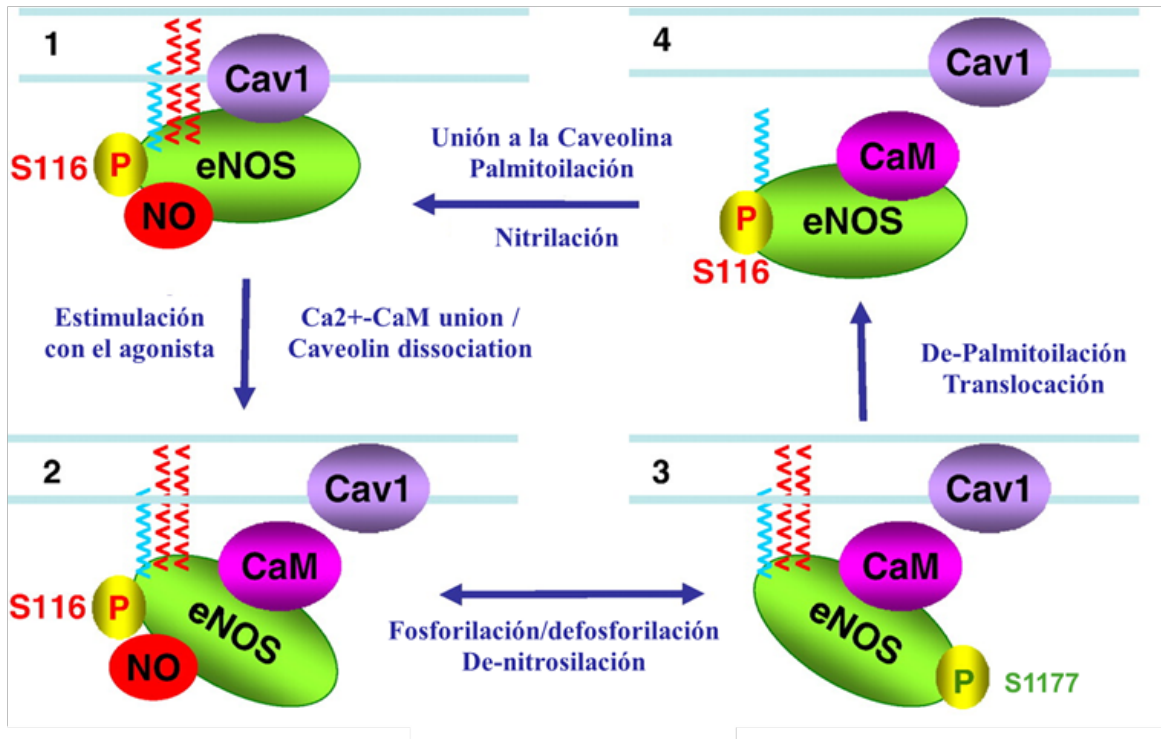


Figura 2.11. Regulación de la activación de eNOS: modificaciones posteriores a la traducción. La regulación de eNOS puede ejercerse a través de la unión del complejo calcio/calmodulina o bien a través de la fosforilación de residuos de aminoácidos en la subunidad reductasa de la eNOS. Panel 1: eNOS quiescentes anclados a la caveolas por miristoilación y palmitoilación (cadenas azul y rojas, respectivamente) e inhibida por la caveolina 1. Panel 2: muestra el desplazamiento de la unión por el calcio-calmodulina caveolina; Panel 3: Forma activa de la eNOS por fosforilación del residuo en serina 1177; y Panel 4: De-palmitoilación de eNOS, translocándose de desde la parte externa de la membrana a la parte interna de la membrana interna por la disociación de CaM y posteriormente, se une nuevamente a la Caveolina 1. Cav1: caveolina 1; CaM: calmodulina; Ser: serina. Esta figura está adaptada de (Dudzinki & Michel 2007).

Además de la regulación por calcio y por fosforilación de residuos tirosina, la actividad de eNOS se puede modificar por la acción de múltiples proteína quinasa, mediante la fosforilación en el residuo serina 1177. Entre estas quinasa se encuentra la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la serina/treonina quinasa Akt. Los factores que activan la eNOS a través de la fosforilación en la serina 1177 mediada por Akt son el estradiol, el VEGF y el factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1) (Bayes-Genis et al. 2000; Hisamoto et al. 2001; Higashi et al. 2010). Por otro lado, la fosforilación del residuo treonina en la posición 497 provoca un descenso de la actividad de eNOS (Michell et al. 2002). Se ha demostrado que las señales a través de la PKA conducen a fosforilación de la serina 1177 y desfosforilación de la treonina 497, aumentando la actividad enzimática de eNOS. Sin embargo, la PKC promueve la desfosforilación de la serina 1177 y la fosforilación de la treonina 497, causando un descenso de la actividad de eNOS (Huang 2009).

El NO sintetizado no ejerce su respuesta biológica principal en las células de origen, sino en las células diana cercanas. El NO promueve la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs), aumentando los niveles intracelulares de guanósil monofosfato cíclico (cGMP) sintetizado por ella, y por consiguiente, provocando vasodilatación (Moncada et al. 1990). El tono vascular se mantiene mediante la liberación endotelial de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras,

siendo el NO el principal agente vasodilatador. Además tiene efectos antiagregantes sobre las plaquetas. Una característica esencial de la disfunción vascular es la pérdida de vasodilatación dependiente de endotelio, lo que se relaciona con una menor biodisponibilidad de NO. Este descenso, puede deberse a una reducción de la actividad y/o de la expresión de eNOS.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) reaccionan con el NO, disminuyendo la cantidad disponible, formando peroxinitritos (ONOO-) (Harrison et al. 2003). Estos radicales libres son oxidantes citotóxicos que causarán la nitración de proteínas, afectando a su función y por tanto a la función endotelial. Los ONOO- son mediadores importantes de la oxidación de LDL, acentuando su papel aterogénico (Karagiannis et al. 2013) (Griendling & FitzGerald 2003). Además, conducen a la degradación del cofactor de eNOS, lo que provoca un desacoplamiento de la enzima, de manera que la actividad oxigenasa y la formación de NO disminuyen, mientras que la actividad reductasa y la formación de ROS, especialmente de anión superóxido (O₂⁻) aumentan, lo que conduce a un incremento del estrés oxidativo y al deterioro de la función endotelial y vascular (Singh et al. 2014). Se ha planteado la posibilidad de que las mitocondrias produzcan ONOO- en normoxia, y O₂⁻ y NO en condiciones de hipoxia (Gupta et al. 2010).

En estados de obesidad y resistencia a la insulina se ha observado una disminución de la biodisponibilidad de NO tanto en modelos animales (Kim et al. 2008) como en los seres humanos obesos y diabéticos (Higashi et al. 2001). En la obesidad, el desequilibrio entre la generación y la degradación de NO puede deberse a una disminución de los niveles de NO, un fallo en la función de las NOS o en la reacción del NO con especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido (Figura 2.12).

Se ha descrito que la eNOs, en estados normales, ejerce efectos anti-obesogénicos y de sensibilización a la insulina, basándose en la capacidad de la enzima para disminuir la síntesis de lípidos y promover la oxidación de grasas en el hígado y el músculo esquelético. Además, NOS3 puede estar implicada en la secreción hepática de sustancia sensibilizante a la insulina (HISS). Todo ello, apoyaría la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos como el músculo esquelético. Sin embargo, en estados de resistencia a la insulina y la obesidad, la isoforma nNOS promueve la hiperfagia, e iNOS pueden promover la inflamación y la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos claves tales como el hígado, el músculo esquelético, y tejido adiposo. Adicionalmente, puede afectar la homeostasis de la glucosa en circulación y hígado, alterando las actividades del páncreas endocrino (Sansbury & Hill 2014).

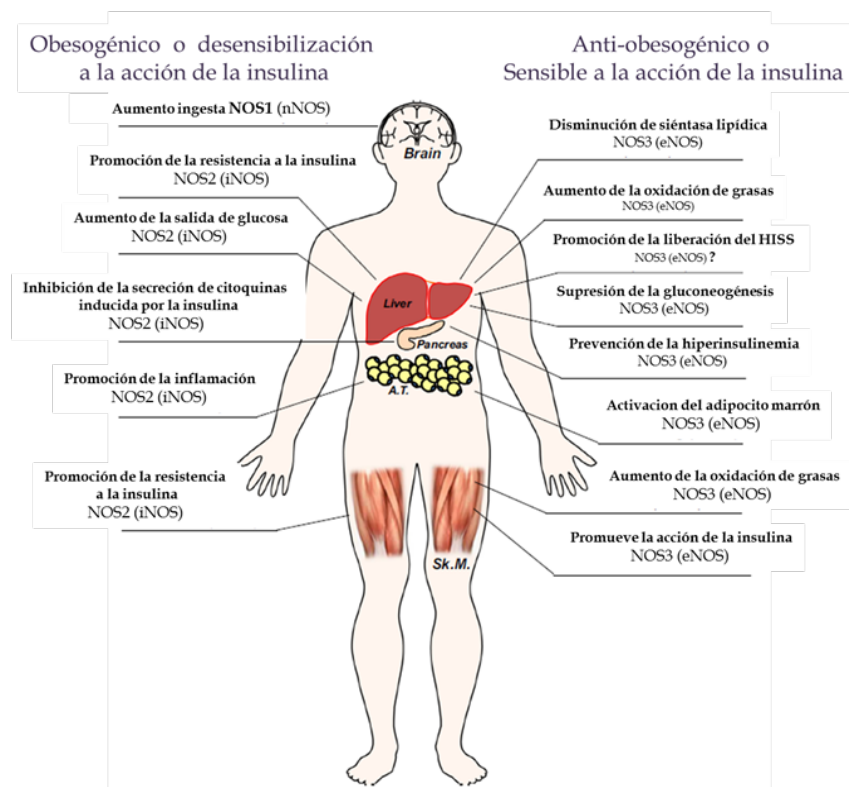


Figura 2.12. Gráfico representativo de los efectos sistémicos de NO sobre la obesidad y el metabolismo. En estados normales de sensibilización a la insulina, eNOS parece ejercer efectos anti-obesogénicos y de sensibilización a la insulina. Sin embargo, en estados de resistencia a la insulina y de obesidad, la isoforma nNOS promueve la hiperfagia e iNOS estaría implicada en la inflamación y la resistencia a la insulina. Figura adaptada de (Sansbury & Hill 2014).

2.3.8.2. La endotelina 1

La endotelina 1 (ET-1) es un péptido producido por las ECs, las VSMCs, los macrófagos, los leucocitos, los cardiomiocitos y los fibroblastos (Resink et al. 1990; Properzi et al. 1995), que tiene efectos sobre el tono vascular. Los receptores de la endotelina están distribuidos por todo el organismo, ya que tiene efectos pleiotrópicos en tejidos no vasculares. La ET-1 desempeña un papel en el control la contracción muscular, la proliferación celular, y activación celular de las células del endotelio, tanto de las VSMCs como de los fibroblastos. Esto se traduce en cambios estructurales en la pared vascular (Golfman et al. 1993). También, se ha descrito que la proteína quinasa C (PKC), la vía de las MAPKs y la cadena ligera de la miosina quinasa (MLCK) contribuyen en la contracción mediada por ET-1.

La ET-1 ejerce acciones vasoconstrictoras a través de la estimulación de los receptores ETA en las VSMCs y acciones vasodilatadoras a través de los receptores ETB de las ECs (Lee L. et al. 2014b). La producción de ET-1 por las ECs se estimula por factores como la adrenalina, Ang II, vasopresina, insulina, trombina, glucosa, citoquinas, factores de crecimiento y estímulos físicos. La expresión de la ET-1 se ve disminuida por quelantes de calcio o inhibidores de la PKC, péptidos natriuréticos y el NO (Emori et al. 1993).

2.3.8.3. La angiotensina II

En el sistema renina-angiotensina clásico, la renina producida por el riñón transforma el angiotensinógeno producido en el hígado en angiotensina I (Ang I). Por acción de la enzima convertidora de angiotensina, la Ang I pasa a su forma activa, la Ang II en circulación, realizando su función principal a través de la unión a sus receptores específicos, AT-1 y el AT-2 (Kurihara et al. 2012). La interacción de la Ang II y sus receptores producen vasoconstricción y liberación de aldosterona en las glándulas adrenales.

Se ha descrito que existen componentes de este sistema renina-angiotensina en distintos tejidos del cuerpo como el corazón (Cohn & Tognoni 2001), la pared vascular (Ruiz-Ortega et al. 2001) y el cerebro (Morimoto et al. 2002), permitiendo la activación y síntesis local de ambos tipos de angiotensina. Existen numerosas evidencias que indican que la AngII tiene acciones proinflamatorias en la pared vascular, lo que conduciría a la progresión de la aterosclerosis (Brasier et al. 2002). Han sido identificados en las VSMCs y en las ECs, la existencia tanto de AT-1 como de AT-2, aunque existe una mayor densidad del receptor AT-1 en ambos tipos celulares. Además, se ha descrito que AT-1 media en gran parte las acciones aterogénicas de la angiotensina II (Daugherty et al. 2010).

Por otro lado, la Ang II aumenta la expresión de moléculas de adhesión, quimioquinas y citoquinas (Pueyo et al. 2000). Estas moléculas inducen disfunción endotelial, captación y oxidación de LDL y proliferación de las VSMCs (Keidar et al. 2001). En lesiones ateroscleróticas avanzadas, la Ang II estimula la expresión de metaloproteasas de la matriz (MMPs) (Luchtefeld et al. 2005) y de PAI-1 (Vaughan et al. 1995), provocando la desestabilización de la placa aterosclerótica y la alteración del balance fibrinolítico.

2.3.8.4. Moléculas de Adhesión

Tanto la disfunción vascular como la posterior formación de la placa aterogénica, son procesos que implican la activación del sistema inmune, para la producción de la inflamación. Las moléculas de adhesión vasculares (CAMs), intervienen en el reclutamiento de macrófagos, linfocitos y plaquetas, se encuentran implicadas en muchas enfermedades inflamatorias. En la aterosclerosis, se ha observado la existencia de un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión en modelos animales y humanos (Zibara et al. 2000). Las moléculas de adhesión son intermediarios cruciales en varios pasos del reclutamiento de leucocitos, de hecho, se ha demostrado que diferentes subconjuntos de moléculas de adhesión son los responsables del rodamiento y adhesión de células inflamatorias circulantes en el endotelio vascular (Bryan et al. 2014). Las moléculas que median estas interacciones pertenecen a tres familias: selectinas, integrinas y miembros de la familia de las inmunoglobulinas (Figura 2.13).

Las selectinas inducen el rodamiento y adhesión de los leucocitos, mediante moléculas de unión (Huo & Ley 2001). Existen tres tipos: 1) la P-selectina se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las ECs y en los gránulos α de las plaquetas, por acción de estímulos proinflamatorios se transloca a la superficie celular (Tedder et al. 1995); 2) la E-selectina no se expresa en condiciones fisiológicas normales, pero se sintetiza y se exporta a la superficie de las ECs en situaciones de inflamación (Kansas 1996); y 3) la L-selectina se expresa en todos los granulocitos, monocitos y en la mayoría de los linfocitos (Ley 2003). En un modelo murino carente del receptor de las LDL, se ha descrito que deficiencias en E- y P-selectina provocan un gran descenso de la extensión de las lesiones ateroscleróticas (Dong et al. 1998).

La integrinas y los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas también se ven envueltos en el reclutamiento de leucocitos, ya que median la adhesión y trasmigración de los leucocitos al interior de la pared vascular. Las integrinas son una familia de receptores compuestos por subunidades α y β que forman heterodímeros $\alpha\beta$ (Hynes 2002). Las integrinas median el contacto célula-célula, célula-matriz extracelular, célula-patógeno y también participan en la co-estimulación, migración y fagocitosis.

Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas se caracterizan por un pequeño dominio citoplásmico, una región transmembrana y varios dominios extracelulares repetidos y parecidos a las IgG (Carlos & Harlan 1994). Entre estas proteínas se encuentran: las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) tipo 1, 2 y 3; la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1); y la molécula de adhesión de ECs y plaquetas (PECAM-1). La función principal de estas moléculas es actuar como receptores de las integrinas. La inhibición de la interacción entre las moléculas de adhesión y sus ligandos, descinde la adhesión de leucocitos, la diapédesis y en algunos casos, también afecta el rodamiento de leucocitos.

El aumento de la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio activado es una característica crítica de la aterosclerosis. La primera evidencia se produjo al observar que se inducía la expresión de VCAM-1 en las ECs, en respuesta a la acumulación de colesterol en la íntima de las aortas (Cybulsky & Gimbrone 1991).

Existen numerosas evidencias de que la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y PECAM-1 están reguladas por factores proaterogénicos. En modelos animales sometidos a dieta aterogénica, se ha observado el rápido aumento de VCAM-1 en el endotelio. Además, se demostró que las LDL oxidadas provocan un aumento de las VCAM-1 (Khan et al. 1995). En placas ateroscleróticas coronarias humanas, se ha observado una expresión elevada de VCAM-1 e ICAM-1, junto a un aumento del número de macrófagos y células T en las regiones de neovascularización de la placa (O'Brien et al. 1996), y en las ECs de aortas susceptibles de neovascularización de placas ateroscleróticas se ha detectado también la expresión de PECAM (Braunersreuther & Mach 2006).

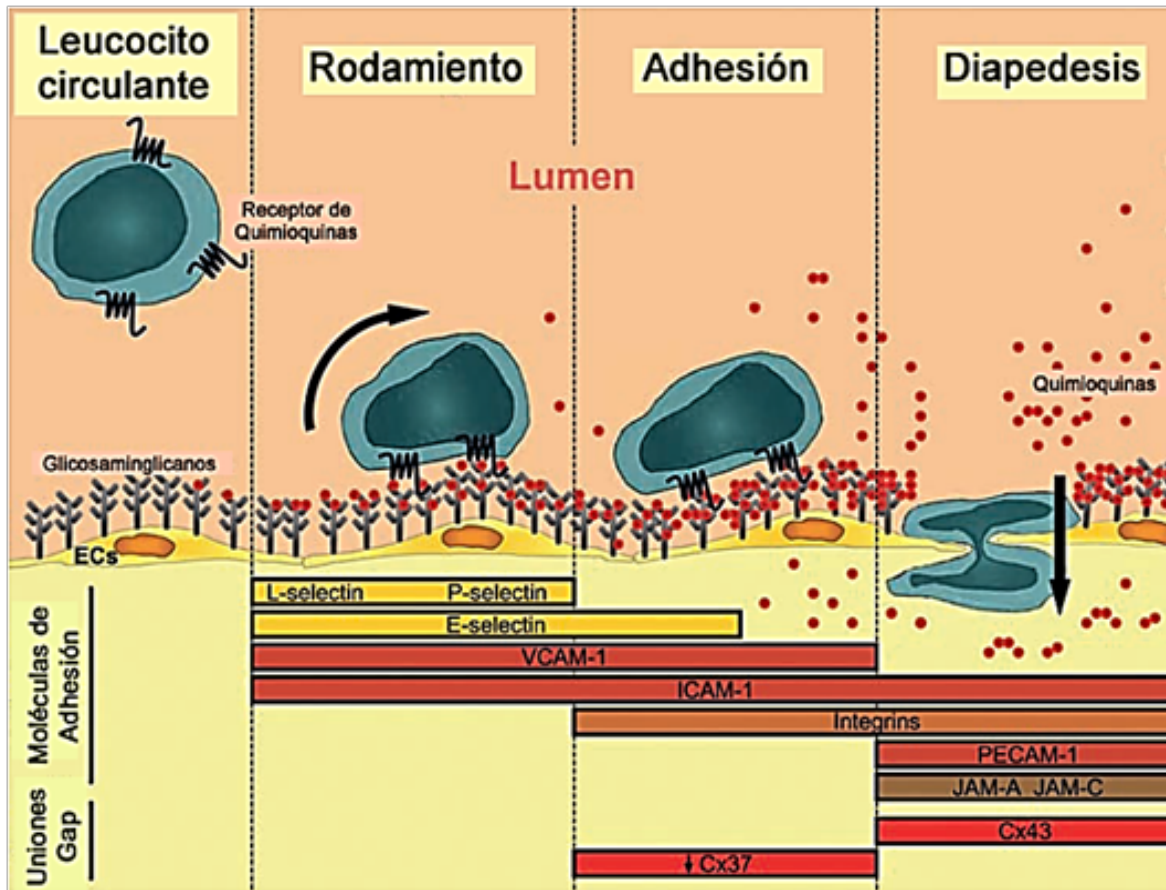


Figura 2.13. Reclutamiento de leucocitos en la progresión del daño vascular. En el gráfico se muestra las diferentes moléculas de adhesión implicadas en el reclutamiento de leucocitos en la progresión de la disfunción endotelial. ECs, células endoteliales; VCAM-1, molécula de adhesión celular vascular-1; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular-1; PECAM-1, molécula 1de citoadhesión de células endoteliales y plaquetas; JAM-A, molécula de adhesión y de unión -A; JAM-C, molécula de adhesión y de unión -C; Cx37, conexina37; Cx43, conexina 43. Adaptado de (Braunersreuther & Mach 2006).

2.3.9. Moléculas que participan en el proceso de inflamación

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

Las citoquinas son péptidos de pequeño tamaño que median la activación, proliferación y migración celular a través de sus receptores de membrana. Tienen funciones a nivel fisiológico, en la homeostasis, participando en la reparación del tejido dañado, pero su producción excesiva conduce a situaciones patológicas, de ahí su implicación en enfermedades inflamatorias, inmunes e infecciosas (Arend & Dayer 1995). Hay dos tipos de citoquinas dependiendo de la función que ejercen: las citoquinas proinflamatorias y las inmunorreguladoras.

Dentro del primer grupo, se encuentran el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleuquina (IL)-1 β y la IL-6. Son sintetizadas por macrófagos, fibroblastos, ECs y son responsables de la

activación de un gran número de células, en las que estimulan la producción de moléculas de adhesión, quimioquinas y otros mediadores inflamatorios (Libby et al. 1995). Desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de la lesión aterosclerótica, siendo liberadas tanto por las células espumosas como por el endotelio dañado. Además, no sólo contribuyen a eventos tempranos como la migración de células polimorfonucleares (PMN) regulando la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y de moléculas de adhesión (Libby et al. 1995), sino también a la progresión de la placa madura.

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

2.3.9.1. Citoquinas

TNF- α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es miembro de un grupo de otras citoquinas que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria por los monocitos, los macrófagos, las células T y B, las células NK, y los leucocitos polimorfonucleares, aunque bajo ciertas condiciones, también puede ser secretado por otros tipos celulares como los adipocitos (Hotamisligil 2010). El TNF- α también media procesos de proliferación, supervivencia o apoptosis celular, mediante diferentes receptores; todos ellos comparten las vías de señalización de activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y de proteínas quinasas activadas por mitógenos (c-jun N-terminal quinasa). La señales apoptóticas y antiapoptóticas son activadas simultáneamente por la misma citoquina en la propia célula (Gaur & Bharat B Aggarwal 2003).

TNF- α activa la lipólisis como un mecanismo para reducir el exceso en los depósitos de grasa. Sin embargo, los altos niveles de TNF- α en el tejido adiposo podrían ser responsables de cualquiera de las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad tales como la resistencia a la insulina. Por lo tanto, el TNF- α aumenta los niveles de ácidos grasos libres y la producción de glucosa hepática (Duncan et al. 2008). Por lo tanto, la neutralización de TNF- α reduce los niveles de glucosa y mejora el control glucémico en pacientes diabéticos tipo 2 (Takano et al. 2010). Del mismo modo, el tratamiento con un anticuerpo anti-TNF- α durante seis semanas reduce la hiperglucemia en ayunas, intolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo blanco visceral de los ratones BATIRKO de 52 semanas de edad, que muestran un aumento de la adiposidad asociada con una lipoatrofia grasa marrón intensa (Gómez-Hernández et al. 2012).

IL-6

La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina pleiotrópica con funciones complejas en la inflamación y enfermedad metabólica (J. J. Fuster & Walsh 2014). Clásicamente, la IL-6 señala a través de la unión con el receptor de membrana IL-6R, aunque este sistema está limitado a los hepatocitos, algunas células epiteliales y algunos leucocitos, y no conducen a la señalización. Sin embargo la trans-señalización de la IL-6 necesita la del receptor soluble para IL-6 (sIL-6R) y disponible en todas las células del cuerpo (Rose-John 2012), iniciando la señalización intracelular a través de la vía JAK/STAT, y la subsecuente activación de la Ras-Raf-MAPK (Heinrich et al. 2003).

Típicamente se ha considerado que la IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria especialmente implicada en enfermedades coronarias. Sin embargo, existen datos contradictorios sobre el papel de IL-6 en la inflamación y el metabolismo. Se plantea una función homeostática de la IL-6 en la limitación de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad, mediante un control de la polarización de los macrófagos en la inflamación (Mauer et al. 2014). También, se ha descrito que promueve un estado antiinflamatorio, con funciones limitadoras para la formación de la placa de aterosclerosis y que es secretada en respuesta al ejercicio físico, mediando sus acciones sensibilizantes a la insulina. Por otra parte, la IL-6 también actúa como una citoquina pro-inflamatoria implicada en la reacción de fase aguda a la lesión tisular. Así, la IL-6 está involucrada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias y su secreción por los tejidos adiposos de los organismos obesos contribuye a la disfunción metabólica (J. J. Fuster & Walsh 2014) (Figura 2.14).

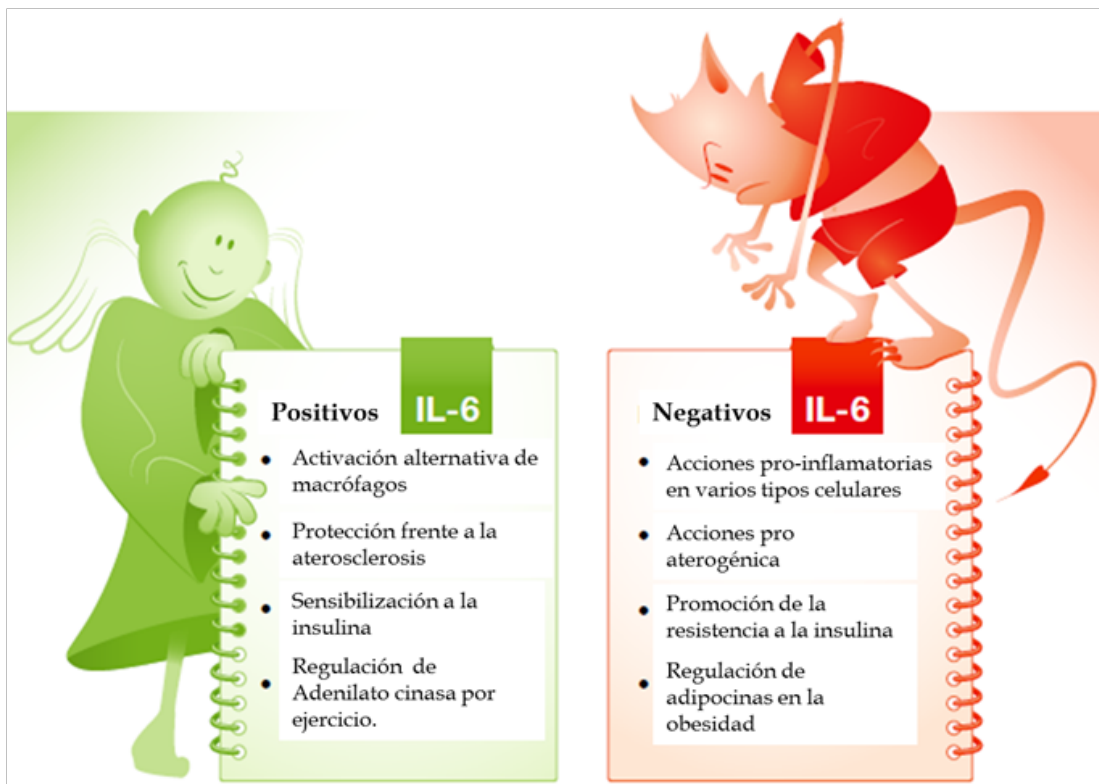


Figura 2.14. Funciones de la IL-6 en la inflamación y enfermedad metabólica. La IL-6 tiene actividades complejas y a menudo contradictorias. Por; por un lado, promueve un estado antiinflamatorio, limita la formación de aterosclerosis y es secretada en respuesta al ejercicio físico, mediando sus acciones sensibilizantes a la insulina. Por otra parte, la IL-6 también actúa como una citoquina pro-inflamatoria implicada de fase aguda y es secretada por el tejido adiposo contribuyendo a la disfunción metabólica. Adaptado de (J. J. Fuster & Walsh 2014).

IL-1 β

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

2.3.9.2. Quimioquinas

Las quimioquinas desempeñan un papel clave en el desarrollo del proceso inflamatorio. Así, MCP-1 se ha detectado tanto en las placas de ateroma humano como en las áreas ricas en macrófagos de las lesiones ateroscleróticas de conejos (Ylä-Herttuala et al. 1991).

Son un grupo de citoquinas de bajo peso molecular caracterizadas por presentar en su estructura primaria cuatro cisteínas (Cys) en posiciones muy conservadas, que se unen mediante puentes de disulfuro intracatenarios (Oppenheim et al. 1991). Los receptores de las quimioquinas presentan siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, por lo que su activación conduce a un aumento de la concentración de AMPc. La interacción de las quimioquinas con sus receptores es muy poco selectiva, de modo que distintas quimioquinas pueden unirse a un mismo receptor y varios receptores pueden interactuar con una misma citoquina. Se clasifican dependiendo de la disposición de las dos Cys más cercanas a su extremo NH₂-terminal, diferenciando dos subfamilias: la subfamilia α (CXC), cuyos miembros presentan un aminoácido separando las dos Cys, y la subfamilia β (CC) en el que las dos Cys están contiguas (Zernecke & Weber 2014). Dentro de la subfamilia α (CXC), son potentes quimioatrayentes de neutrófilos pero no de PMN, son producidas por una gran variedad de células como linfocitos T, neutrófilos, fibroblastos, ECs, epiteliales y PMN (Zernecke & Weber 2014). La otra subfamilia de quimioquinas, la subfamilia β (CC), posee una funcionalidad muy heterogénea, aunque ninguna de ellas es capaz de atraer neutrófilos, sin embargo son potentes quimioatrayentes de PMN, el ejemplo más representativo es MCP-1, que además de inducir la expresión de integrinas en esas células, atrae a linfocitos T y monocitos y activa la liberación de histamina por los basófilos (Zernecke et al. 2008).

2.3.9.3. Prostanoides y el tromboxano A₂

Los prostanoides son productos de la ciclooxigenasa (COX) derivados de ácidos grasos poli-insaturados. Se clasifican en prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (Tx). Ejercen una gran variedad de acciones en diferentes tejidos y células. Las acciones más típicas son la vasorrelajación y vasoconstricción de varios tipos de músculo liso. También, están implicados en apoptosis, diferenciación celular y oncogénesis. Asimismo, participan en la regulación de la actividad plaquetaria y en la homeostasis (Narumiya et al. 1999). La biosíntesis de los prostanoides consta de tres pasos: 1) la liberación de ácidos grasos de la membrana, siendo el ácido araquidónico (AA) el más abundante de todos ellos; 2) su conversión en un endoperóxido inestable (PGH₂); y 3) la isomerización o reducción de este producto intermedio hasta formar las PGs (PGD₂, PGE₂, PGF₂), prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TxA₂) (Yang et al. 2013) (Figura 2.15). El TxA₂ es sólo producido por las membranas de las plaquetas y actúa como un potente agente agregante plaquetario y vasoconstrictor. El TxA₂ es el responsable de múltiples procesos biológicos a través de la unión a su receptor TP. TxA₂ cobra importancia en la diabetes mellitus, que

normalmente se asocia con la hiperactividad de las plaquetas, lo que conduce a un aumento de la morbilidad y la mortalidad por enfermedad cardiovascular, además del aumento de los niveles del tromboxano y de eicosanoides que facilita la agregación plaquetaria (Yang et al. 2013).

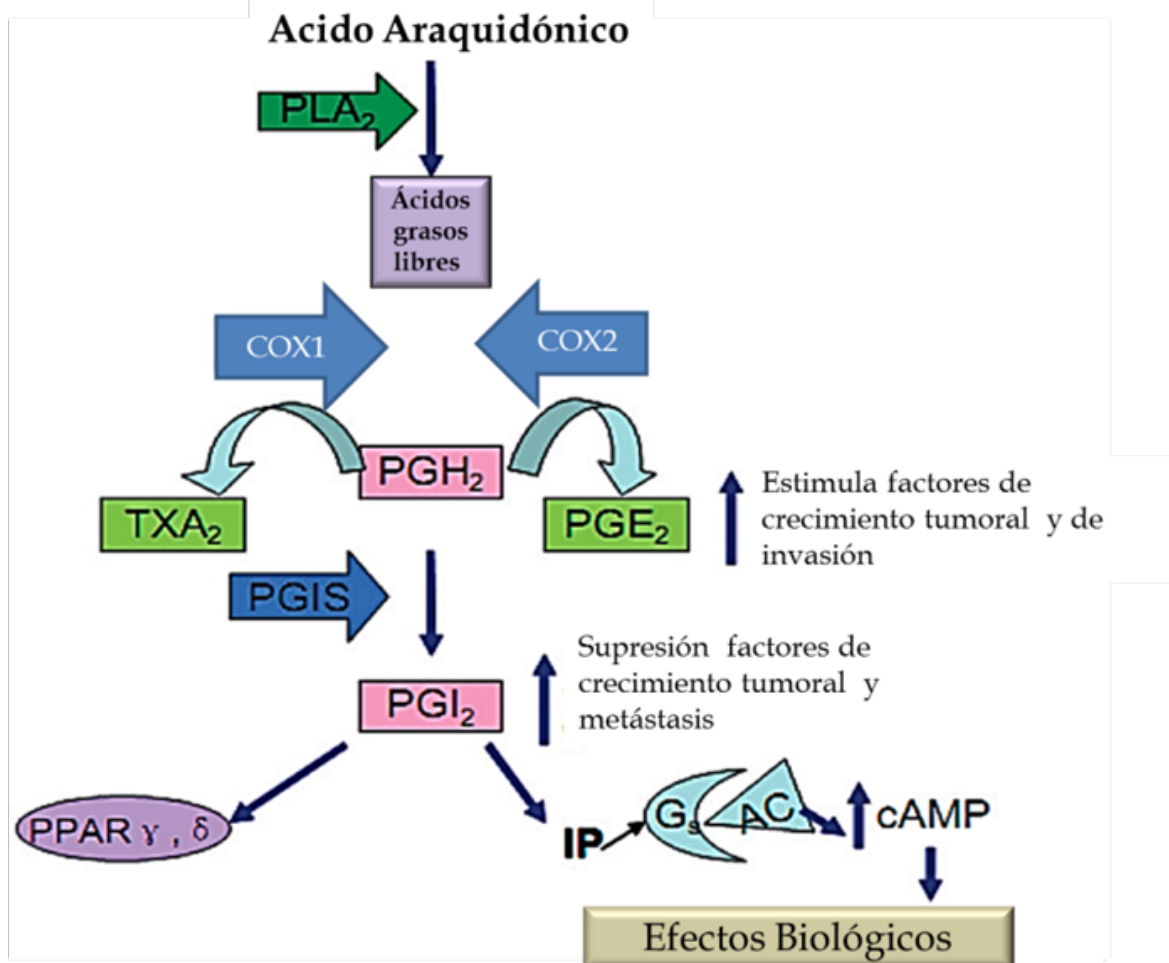


Figura 2.15. Biosíntesis de los prostanoideos. La activación de la célula de la proteína G acoplada IP receptor de membrana conduce a un aumento de los niveles de cAMP y la modulación de los objetivos relacionados con la vasodilatación y la angiogénesis. La prostaciclina y su análogo puede activar a PPAR γ , δ (Yang et al. 2013).

2.3.9.4. Las especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidativo juega un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades humanas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluye peróxido de hidrógeno, anión superóxido, peróxidos y radicales hidroxilo entre otros, están implicados en el crecimiento, la diferenciación, la progresión y la muerte de la células (Lorenzo et al. 2013). Las bajas concentraciones de ROS tiene un papel indispensable en la señalización intracelular y la defensa contra los patógenos, en tanto que, cantidades más altas de ROS juegan un papel en varias enfermedades humanas, incluyendo la artritis, el cáncer, la diabetes, la aterosclerosis, la isquemia, los fallos en las funciones de inmunidad y en el metabolismo (Rajendran et al. 2014). Se ha demostrado que las ROS inician diferentes procesos incluidos de señalización, autofagia, quimotaxis, presentación de antígenos y modulación inmune (Padgett et al. 2013).

En general, se ha descrito que en la aterogénesis, ROS puede aumentar la expresión de moléculas de adhesión, la estimulación de la proliferación y migración de VSMCs, la apoptosis en el endotelio, la oxidación de lípidos, la activación de metaloproteasas y la alteración de la actividad vasomotora (Singh et al. 2014). Además, se ha descrito que factores de riesgo de la arteriosclerosis como la diabetes, la hipertensión o el tabaquismo aumenta los niveles de ROS (Gan et al. 2013; Kim et al. 2007). Las ROS participan en la aterosclerosis a través de varios sistemas enzimáticos: xantina oxidasa (XO), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y la óxido nítrico sintasa (NOS) (Harrison et al. 2003). Estas enzimas utilizan diferentes sustratos como fuentes de electrones y reducen al oxígeno para formar una gran variedad de ROS. La reducción de un electrón del oxígeno conduce al anión O_2^- y de dos electrones, al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La dismutación del O_2^- al H_2O_2 está catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) (Csiszar et al. 2007) (Figura 2.15).

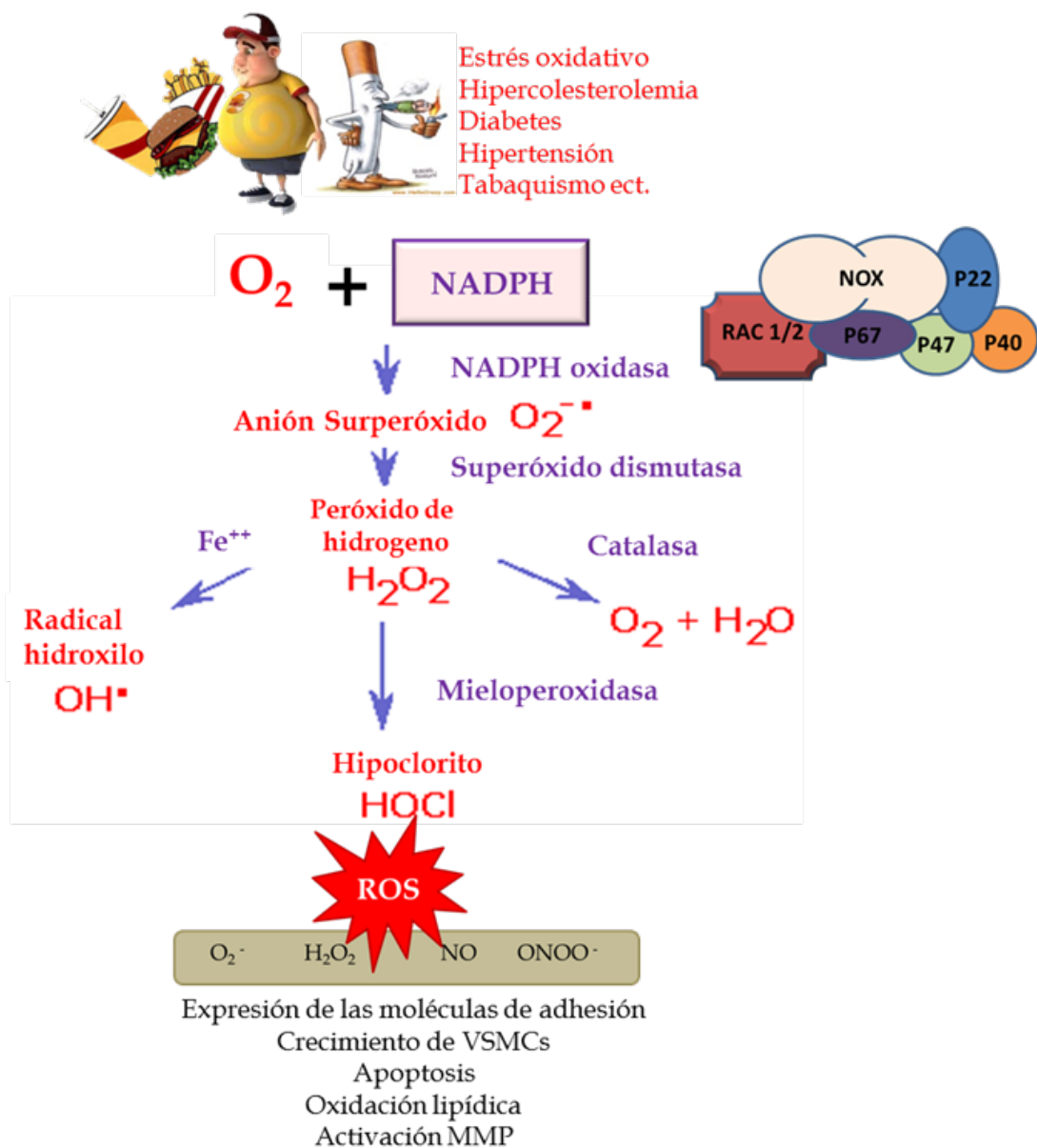


Figura 2.15. Reacciones que conducen a la formación de las ROS y su papel en la aterosclerosis.

2.3.9.5. Inhibidor del activador del plasminógeno 1

La degradación proteolítica de los coágulos de fibrina está mediada por la enzima plasmina. Se forma en la circulación a partir de un precursor inactivo denominado plasminógeno, por mediación de la acción proteolítica de los factores activadores del plasminógeno (PA). El inhibidor del PA se denomina inhibidor del activador del plasminógeno (PAI); su síntesis es regulada por numerosas sustancias como endotoxina, IL-1, TNF- α , trombina y diversos factores de crecimiento (Travis & Salvesen 1983).

El PAI más estudiado es el tipo endotelial o (PAI-1; SERPINE1), que es una glicoproteína de peso molecular bajo, un inhibidor de proteasa serínica (Fortenberry 2013). PAI-1 es sintetizado por las ECs, las VSMCs, los adipocitos y los hepatocitos. Es el principal inhibidor fisiológico de los activadores tipo t-PA (tisulares) y u-PA (urinarios) y regula la trombosis. Varios estudios han demostrado que el PAI-1 contribuye a la fisiopatología de la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular (Vaughan et al. 1995). Además, PAI-1 también ha sido implicado en otras patologías como el cáncer, la obesidad y el síndrome metabólico (Iwaki et al. 2012). Existe una correlación positiva de altas concentraciones de PAI-1 con alteraciones de la glucemia, la presión arterial sistólica y los triglicéridos (Ingelsson et al. 2007).

Los niveles plasmáticos de PAI-1 en sujetos sanos están entre 0,5-40 U/ml (Loskutoff et al. 1989) en tanto que en condiciones patológicas aumenta su expresión y contribuye directamente a la proliferación y migración de las células de músculo liso vascular (Chen 2006). En la obesidad, los niveles de PAI-1 están aumentados a expensas de la grasa visceral (Kato et al. 2006). En los hepatocitos, PAI-1 está regulado por la insulina. Durante la inflamación en la aterosclerosis, el endotelio se convierte en antifibrinolítico y procoagulante, debido que hay un aumento de citoquinas proinflamatorias que inducen la liberación de PAI-1 (Loskutoff et al. 1989). En los individuos con enfermedad coronaria, hiperinsulinemia, diabetes tipo 2 y otras enfermedades tromboticas los niveles plasmáticos de PAI-1 se encuentran elevados (Fortenberry 2013).

2.3.9.6. Hormonas

La leptina es secretada principalmente por los adipocitos desempeñando un papel importante en la regulación del peso corporal a través de sus efectos sobre el apetito, el gasto energético corporal y el sistema neuroendocrino. Esta hormona, en músculo esquelético e hígado activa a la AMPK, pero la inhibe en hipotálamo y en músculo cardíaco (Kola et al. 2006). Sujetos obesos presentan altas concentraciones de leptina y se incrementan en relación con el grado de adiposidad y la hiperinsulinemia, lo que ha llevado al concepto de resistencia a la leptina (Carter et al. 2013). Esta hiperleptinemia ha estado involucrada en la resistencia a la insulina de los obesos a través de alteraciones en la fosforilación del receptor de insulina.

La adiponectina también es secretada por los adipocitos y participa en control de la ingesta de alimentos. Se ha descrito que concentraciones bajas de adiponectina están relacionadas con un aumento en el metabolismo y el riesgo cardiovascular (Kumada et al. 2003). La adiponectina aumenta la relación AMP/ATP permitiendo la fosforilación de la treonina 172 de AMPK α , y controla el metabolismo de glucosa y ácidos grasos incrementando la β -oxidación. Otra hormona adipocítica es la resistina, que tiene el efecto opuesto a la adiponectina (Sanz 2008).

2.3.9. Señalización del NF- κ B

El NF- κ B es un dímero que se expresa ubicuamente (Sen & Baltimore 1986). Está implicado en la regulación de diversos procesos celulares como la inflamación, la adhesión, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, entre otros (Gasparini et al. 2014; Sandireddy et al. 2014; SenBanerjee et al. 2011). NF- κ B está constituido por proteínas de la familia Rel, que se encuentra en el citoplasma en forma inactiva unido a proteínas inhibitoras, las cuales, después de un estímulo adecuado son fosforiladas, ubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma, permitiendo así la liberación de NF- κ B que se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes diana, entre los cuales están: Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bim, Mn-SOD, entre otros (Beinke & Ley 2004). El NF- κ B se activa por varios estímulos como infecciones, estrés oxidativo y daño en el DNA. Su activación se produce por las vías de señalización del receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1), el receptor 1 de la interleuquina 1 (IL-1R1), el receptor similar a Toll (TLR), el receptor de células B (BCR), el receptor de células T (TCR), receptor de linfotóxina β (LT β R), el factor activador de células B (BAFFR) y el clúster de diferenciación 40 (CD40) (Gloire et al. 2006).

La familia Rel está constituida por cinco proteínas que contienen dominios homólogos y que forman entre ellas homo o heterodímeros; estas proteínas son: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB; de éstas sólo las tres últimas tienen el dominio transactivador, indispensable para reconocer el promotor de los genes diana (Beinke & Ley 2004). Todos los miembros de la familia NF- κ B presentan un dominio N-terminal común llamado Rel Homolog Domain (RHD), formado por 300 aminoácidos responsables de la dimerización entre los miembros de la familia NF- κ B, de las asociaciones con el inhibidor I κ B y con el motivo κ B del DNA (Hoffmann et al. 2006). La formación del homodímero o heterodímero es determinante en la actividad transcripcional en los promotores de los genes diana. El heterodímero p50/p65 es el más común y su actividad transcripcional ocurre gracias a la proteína p65 (Wegener & Krappmann 2008). Los homodímeros p50 y p52 no poseen actividad transcripcional, aunque estimulan la transcripción cuando se unen a la proteína nuclear parecida al inhibidor de κ B (Bcl-3) (Fujita et al. 1993). Los dímeros NF- κ B se encuentran de forma inactiva en el citosol formando complejos con los inhibidores de la familia de los I κ Bs, conformada por I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , I κ B δ y Bcl-3 que contienen múltiples repeticiones de ankirinas, las cuales interactúan con los dominios RHD del NF- κ B previniendo la translocación de éste (Beinke & Ley 2004). El proceso de separación de I κ B requiere su fosforilación (Rahman & Fazal 2011), una vez fosforiladas las proteínas I κ Bs son ubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma (Ghosh et al. 1998; Baker et al. 2011).

La fosforilación de los inhibidores I κ Bs en respuesta a distintos estímulos requiere la activación de una serina-treonina quinasa de la familia de los inhibidores de NF- κ B (IKKs), que está constituida por IKK α , IKK β e IKK γ y una subunidad reguladora de NF- κ B (NEMO) (Huang & Hung 2013). Los inductores de NF- κ B, a través de diferentes receptores y proteínas adaptadoras, desencadenan señales que convergen en la activación del complejo IKK (Yamaoka et al. 1998). Los homodímeros o heterodímeros de IKK α o IKK β fosforilan a las proteínas I κ Bs induciendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma, permitiendo así la liberación de NF- κ B que se transloca al núcleo (Tang et al. 2003; Baker et al. 2011). NEMO, es un polipéptido de 48 kDa, rico en ácido glutámico (Glu) y glutamina, que forma multímeros mediante los dominios superenrollados CC1, CC2, dominios ricos en leucina (LZ) y el dedo de Zn. El CC1 es necesario para la interacción con las quinasas IKK α e IKK β , el CC2 media la oligomerización y el LZ es crítico para la translocación nuclear (Huang & Hung 2013). NEMO regula la fosforilación de IKK β con la ayuda de una proteína rica en ácido glutámico, leucina, lisina y serina,

permitiendo su activación. A su vez, el inhibidor I κ B- α es fosforilado en la Ser 32 y Ser 36 por IKK β activo. Este cambio postraducciona l de I κ B α sirve de seña l para la ubiquitinación en las Lys 19 y 21, llevando a la subsecuente degradación por la vía del proteosoma 26S, quedando así el NF- κ B libre, que se transloca al núcleo donde puede activar la transcripción de genes de citoquinas, quimioquinas y moléculas proinflamatorias, apoptóticas que participan todas ellas en el proceso aterosclerótico (Wan & Lenardo 2010).

2.3.9.1. Activación del NF- κ B por la vía canónica

La ruta clásica del NF- κ B es la forma más común de activación en todas los tipos celulares, la cual es inducida por una variedad de mediadores de respuesta inmune innata y adaptativa, tales como citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL-1) (Martin & Fresno 2000), la activación del receptor similar a Toll (TLR) y los receptores de antígenos (Bauer et al. 2009), al estrés oxidativo, etc (Baker et al. 2011). Todas estas cascadas de señalización convergen en la activación del complejo IKK y en la degradación de I κ B α , permitiendo la liberación de los heterodímeros p50/RelA y p50/c-Rel (Gloire et al. 2006). La activación de la vía depende de la fosforilación de las IKK α e IKK β en los residuos Ser181 y Ser180, respectivamente. El complejo IKK activo fosforila la I κ B α en las Ser32 y Ser36 para que sean ubiquitinizadas y posteriormente degradadas en el proteosoma 26S, permitiendo la liberación de NF- κ B y la consiguiente modulación y transcripción de genes diana (Figura2.16)(Wan & Lenardo 2010).

2.3.9.2. Activación del NF- κ B por la vía no canónica

La ruta alternativa, independiente de NEMO, también conocida como I κ B independiente, se caracteriza por la activación del heterodímero RelB/p52. Esta vía es inducida en respuesta al factor activador de células B, (Claudio et al. 2002), LT3(ligando de CD40), virus de leucemia humana tipo I de células T (HTLV) y virus de Epstein-Barr (EBV), y en ella participa la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) (Li K. et al. 2013a). La activación de la vía no canónica de NF- κ B depende de la activación del homodímero IKK α a través de NIK, desencadenando su interacción con la proteína p100 que está unida a RelB. La fosforilación de p100 es seguida por su procesamiento en proteosoma a p52 y por la translocación del complejo RelB/p52 al núcleo (Gloire et al. 2006; Li K. et al. 2013a) y la consiguiente modulación de la transcripción de genes diana como Cox-2, ciclina D, Mn-SOD, BCL-x (Figura2.16).

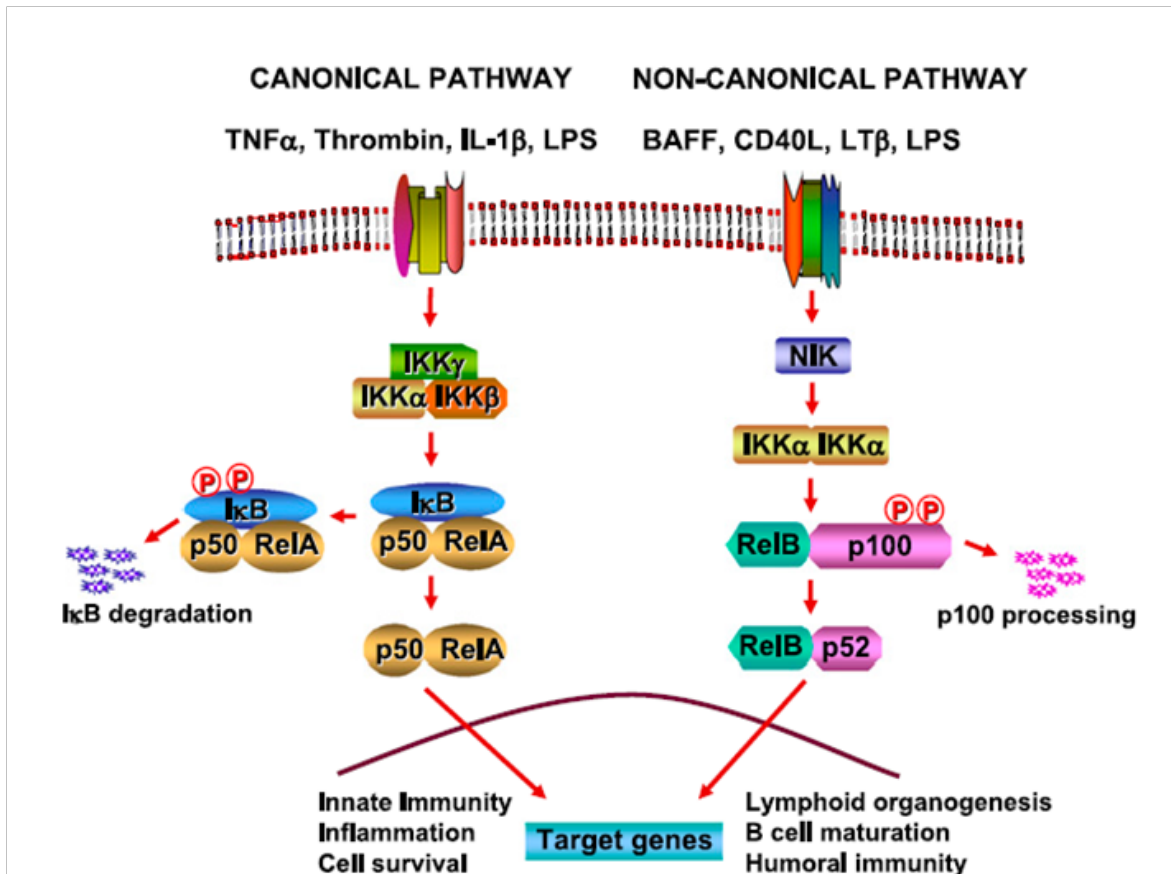


Figura 2.16. Activación de la vía clásica y vía canónica del factor de transcripción NF- κ B

2.4. Síndrome metabólico y sus complicaciones

La combinación de resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria aumenta la probabilidad de hipertensión, y una dislipidemia caracterizada por niveles altos de triglicéridos en plasma (TG) y la disminución de la concentración del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), aumentando el riesgo de CVD. Por lo tanto, la hiperglucemia y la resistencia a la acción de la insulina parecen tener un importante papel en el desarrollo de las complicaciones patogénicas macrovasculares (Wei et al. 1998; Ebara et al. 2000). Al conjunto de anomalías metabólicas relacionadas entre ellas, se denomina síndrome metabólico (Reaven 2005). En los últimos años la prevalencia de la obesidad y el síndrome metabólico, y sus subyacentes complicaciones como el daño cardiovascular, ha aumentado (Da Silva et al. 2013), siendo éste último una de las principales causas de muerte en las sociedades occidentales (Haffner & Taegtmeier 2003; Estruch et al. 2014).

A lo largo de los años se ha asociado la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria con diferentes enfermedades como por ejemplo, el síndrome de ovario poliquístico, que parece ser secundario a la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria, el hígado graso no alcohólico y trastornos respiratorios del sueño; además, se reconoce que todos estos

síndromes clínicos adicionales relacionados con la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia aumentan el riesgo de CVD.

Estudios clínicos y epidemiológicos apoyan una conexión entre la obesidad y la trombosis, que implica una elevada expresión de las moléculas protrombóticas activadoras del inhibidor del plasminógeno-1, el factor tisular (TF) y el aumento de la activación de plaquetas. Las enfermedades cardiovasculares y trastornos asociados al síndrome metabólico, incluyendo la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, y la esteatosis hepática, implican la inflamación provocada por la infiltración y la activación de las células inmunes, particularmente los macrófagos, en el tejido adiposo (Samad & Ruf 2013). Las elevadas concentraciones plasmáticas de PAI-1 se asocian con un aumento de las enfermedades cardiovasculares. El primer paso en el proceso de aterogénesis es la unión de células mononucleares al endotelio, además las células mononucleares aisladas de individuos resistentes a la insulina con hiperinsulinemia se adhieren con mayor avidez.

Este proceso es modulado por moléculas de adhesión producidas por las células endoteliales, y hay una relación significativa entre el grado de resistencia a la insulina y la concentración plasmática de varias de estas moléculas de adhesión. Otra prueba de la relación entre la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial es el hallazgo asimétrico de la dimetilarginina, un inhibidor endógeno de la enzima óxido nítrico sintasa, que aumenta en individuos con hiperinsulinemia o resistentes a la insulina. Finalmente, las concentraciones plasmáticas de varios marcadores inflamatorios son elevadas en los sujetos resistentes a la insulina. Es obvio que el conjunto de anormalidades asociadas con la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria contiene muchos factores reconocidos del riesgo de ECV, y determinar los factores responsables de la aceleración del síndrome metabólico no es una tarea sencilla y requiere de muchos estudios multidisciplinarios.

También, se ha demostrado que la hiperglucemia promueve la formación de especies reactivas de oxígeno como una reacción de la glicosilación de proteínas (Rosen & Spiegelman 2006). La oxidación de los ácidos grasos y de la glucosa están estrechamente interrelacionadas, los ácidos grasos son capaces de inhibir la utilización de glucosa de forma aguda, mientras que, la glucosa es capaz de inhibir la oxidación de ácidos grasos en algunos tejidos como en el corazón y en el músculo esquelético. Evidencias sugieren que la disponibilidad de glucosa sostenida en el tiempo podría bloquear la utilización de ácidos grasos a nivel de la expresión génica, descendiendo la asimilación de ácidos grasos no sólo a través de la expresión de PPAR α , sino también a través de la activación de factores de transcripción que se unen al promotor de los genes del metabolismo de los ácidos grasos. Se ha formulado la hipótesis de que un exceso de lípidos y ácidos grasos, a través de acil-CoA de cadena larga, provocaría un aumento de las ceramidas intracelulares que más tarde induciría la acumulación de ROS, iNOS y apoptosis.

Para la valoración de los sujetos con síndrome metabólico (Mets) según la Federación Internacional para la Diabetes (IDF) se utilizan cinco parámetros: los niveles de triglicéridos, de colesterol HDL, de glucosa en ayunas y presión arterial; un sujeto que cumpla tres o más de los cinco criterios descritos se clasificara como síndrome metabólico (Tabla 2.3).

Criterios	Valores de referencia	
	Hombre	Mujer
Obesidad central	>94 cm	>80 cm
Triglicéridos	> 150 mg/ml > 1,7 mmol/L	
Colesterol HDL	< 40 mg/ml < 1,03mmol/L	< 50 mg/ml < 1,29mmol/L
Presión arterial	TAS/TAD 130/85 mm Hg	
Glucosa en ayunas	> 100 mg/dl 5,6 mmol/L	

Tabla 2.3. Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico

2.5. Papel de las proteínas desacoplantes (UCPs) en las alteraciones metabólicas

Las mitocondrias se encuentran en el citoplasma de todas las células eucariotas y están implicadas en muchos procesos esenciales para la supervivencia celular, incluyendo la producción de energía, el control redox, la homeostasis del calcio y de ciertas vías metabólicas y de biosíntesis (Echtay 2007). Además, las mitocondrias son la principal fuente de ROS y desempeñan a menudo un papel esencial en el mecanismo de muerte celular fisiológica, también se encuentran relacionadas con patologías tan diversas como el cáncer, diabetes, obesidad, entre otras (News-holme et al. 2007; Diano & Horvath 2012; J. Liu et al. 2013; Alves-Bezerra et al. 2014).

Dentro de las actividades metabólicas de las mitocondrias está realizar la fosforilación oxidativa, el ciclo del ácido cítrico, la β -oxidación de los ácidos grasos, la síntesis y la degradación de los aminoácidos y la generación de calor por disipación del gradiente de protones. La familia de las proteínas transportadoras mitocondriales facilita el intercambio de moléculas altamente específicas entre el citosol y el espacio de la matriz mitocondrial, para llevar a cabo las diferentes vías metabólicas. Las mitocondrias de eucariotas contienen típicamente entre 34 y 60 transportadores diferentes, que son todos codificados por el DNA genómico (Wohlrab 2010).

Las proteínas desacoplantes (UCPs) son una familia de proteínas portadoras de aniones situados en el interior de la membrana mitocondrial (Rousset et al. 2004), que permiten el transporte pasivo de protones desde el espacio intermembranal a la matriz, esta actividad de transporte permite el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Kikusato & Toyomizu 2013). Las UCPs disipan el gradiente de protones formados por el sistema de transporte de

electrones y desempeñan funciones en la homeostasis de la temperatura corporal por la termogénesis (de Brondani et al. 2012). La liposolubilidad de la membrana de la mitocondria permite a las UCPs que se difundan y transporten protones a la membrana interna sin pasar por la ATP sintasa, de manera que parte de la energía derivada de la oxidación de los sustratos se disipa en forma de calor. Por tanto, como consecuencia de la acción de estas proteínas se produce un desacoplamiento entre el consumo de oxígeno y la generación de ATP (Krauss et al. 2003). Lo cual provoca que la membrana interna pierda su integridad estructural y, por extensión, las mitocondrias también. En este caso, se dice que son porosas (leaky) (Figura 2.17) (de Brondani et al. 2012).

Además, las UCPs están involucradas en la disminución de la producción de ROS (Schrauwen & Hesselink 2002; Schrauwen et al. 2003). Se ha propuesto que el desacoplamiento suave causado por las UCPs puede disminuir la producción de ROS mitocondrial mediante la reducción de la fuerza motriz de protones y la concentración local de oxígeno (Kikusato & Toyomizu 2013). Las UCPs están involucradas en la preservación de la homeostasis de ROS, un desequilibrio en este, se asocia con enfermedades cardiovasculares (Kim et al. 2007). Es importante recordar que los ROS son derivados del metabolismo del oxígeno molecular que existe en equilibrio con la bioquímica antioxidante; cuando este equilibrio se rompe debido al exceso de ROS, al agotamiento de antioxidantes, o una combinación de ambos, genera el estrés oxidativo alterando el metabolismo de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos (de Brondani et al. 2012), además de aumentar la muerte celular y mecanismos implicados en patologías, tales como la DM2 y sus complicaciones (Wu et al. 2011; Liu et al. 2013).

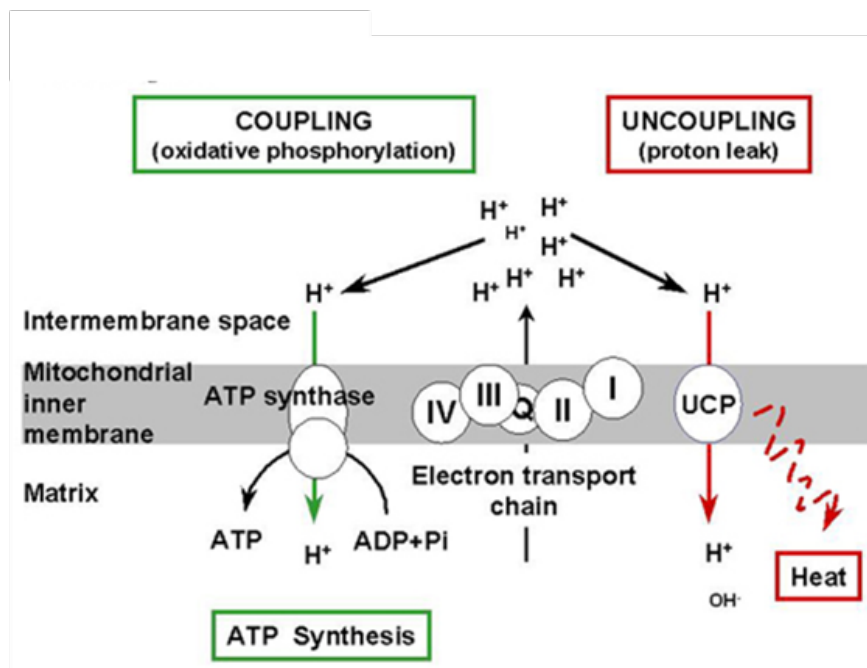


Figura 2.17. Ubicación y función de las UCPs en la cadena respiratoria mitocondrial (MRC). Números I-IV corresponde a los complejos de MRC. ATP-sintasa es el quinto complejo de la MRC. Durante la respiración, los protones son bombeados a través de los complejos de MRC, y se genera un gradiente de protones. La energía del gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP por el complejo ATP-sintasa. Las UCPs catalizan nuevamente la entrada regulada de protones en la matriz, desacoplamiento la MRC y, en consecuencia, la reducción de la síntesis de ATP, con generación de calor.

La familia de las UCPs está integrada por cinco subtipos: UCP-1, UCP-2, UCP-3, UCP-4 y UCP-5 (Rousset et al. 2004). Basándose en la estructura cristalina y varios estudios bioquímicos realizados principalmente en UCP-1, se ha postulado que las UCPs tienen una estructura con tres dominios de repetición, cada uno con dos regiones de α -helice transmembranal hidrófoba que abarcan la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna. Dentro de cada repetición existe un bucle hidrofóbico orientado hacia el lado de la matriz de la membrana. Las UCPs en monómero tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa tanto con el N y los extremos C-terminales orientados hacia el lado citosólico de la membrana mitocondrial interna (Echtay 2007), aunque, se ha postulado que la forma funcional de UCPs es un homodímero (Klingenberg & Huang 1999).

Los principales sitios de expresión de UCP-1 y UCP-3 son el tejido adiposo marrón y el músculo, respectivamente (Almind & Kahn 2004; Bezaire et al. 2007), ejerciendo su función en la termogénesis (Nabben & Hoeks 2008; Guillén et al. 2013). UCP-1 juega un papel importante en el equilibrio y la regulación metabólica y energética, la termogénesis inducida por la dieta y el frío, y en la disminución de la producción de ROS.

UCP-2 se ha encontrado en varios tejidos, como el hígado, cerebro, páncreas, tejido adiposo, bazo, riñón, y los sistemas inmune y nervioso central (Simon-Areces et al. 2012; Diano & Horvath 2012; Stark et al. 2012; Gómez-Hernández et al. 2014). UCP-2 se ha relacionado con una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos, por lo cual la comprensión de los mecanismos moleculares de UCP-2 es fundamental para el desarrollo de estrategias terapéuticas (Donadelli et al. 2014). En grupos de sujetos obesos existen alteraciones de UCP-2 sugiriendo que los polimorfismos de ésta se asocian con la obesidad, el síndrome metabólico y sus enfermedades relacionadas (Lim et al. 2012; de Brondani et al. 2014).

UCP-4 y UCP-5 se han relacionado con un posible papel protector frente al estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial; estas se expresan principalmente en cerebro (Ramsden et al. 2012), aunque recientemente también se ha descrito la presencia de UCP-4 en sangre de ratas (Alves-Bezerra et al. 2014). De forma general, las UCPs son atractivos candidatos para el tratamiento del estrés oxidativo y las enfermedades relacionadas con éste, como la obesidad y la diabetes tipo 2.

2.6. Papel de los ácidos grasos en las alteraciones metabólicas

2.6.1. Transporte y clasificación de los ácidos grasos

Una vez que el organismo satisface los requisitos energéticos de las células, el exceso de sustratos oxidables se almacena en forma de triglicéridos, aumentando los depósitos lipídicos (Janßen & Steinbüchel 2014). En la mayoría de los sujetos obesos, los niveles de FFA se incrementan y éstos se han asociado en varias ocasiones con la resistencia a la insulina (Boden 2001). Sin embargo, la biosíntesis de los ácidos grasos es una de las vías más ubicuas en los organismos, siendo estos precursores de fosfolípidos, esfingolípidos, esteroides (Janßen & Steinbüchel 2014). Los ácidos grasos (FAs) también funcionan como moléculas de señalización en diversos pro-

cesos fisiológicos como metabolitos secundarios. En plasma, los FAs están unidos a proteínas transportadoras como la albumina (van der Vusse 2009), aunque los FAs también se pueden unir a la familia de proteínas citoplasmáticas de unión a ácidos grasos (FABP). Las FABP están involucradas en la unión de los ácidos grasos a su ligando y la entrada de los ácidos grasos a los compartimentos celulares, modulando el metabolismo lipídico intracelular, y la regulación de la expresión génica (Boord et al. 2002).

Las FABPs citosólicas permiten la entrada y salida celular de ácidos grasos y otros ligandos hidrófobos, como la captación y el metabolismo de ácidos grasos de cadenas largas (hígado, intestino), su oxidación (riñón, corazón, músculo esquelético) y su almacenamiento (adiposo). Existen al menos nueve miembros de la familia FABPs que se expresan de manera específica de tejido: hígado (L-FABP), intestinal (I-FABP), corazón (H-FABP), adipocitos (A-FABP), epidérmico (E-FABP), ileal (Il-FABP), cerebro (B-FABP), la mielina (M-FABP) y los testículos (T-FABP) (Smathers & Petersen 2011). En los hepatocitos, adipocitos y miocitos cardíacos, donde los ácidos grasos son sustratos prominentes para la biosíntesis de lípidos, almacenamiento o distribución, los respectivos FABPs representan entre el 1% y 5% de todas las proteínas citosólicas solubles. Además, las FABPs participan en el metabolismo de ácidos grasos y en el balance de energía, siendo asociadas con la obesidad y la resistencia a insulina (Shi et al. 2012).

La estructura general de los genes que codifican para FABPs es altamente conservada, consta de cuatro exones separados por tres intrones. Sin embargo, la longitud del intrón es variable entre isoformas. El mapeo cromosómico de los miembros de la familia FABP ha identificado 9 genes hasta el momento (FABP 1-9) y un posible nuevo miembro de la familia, FABP12, que ha sido menos estudiado. La conservación evolutiva de estos genes sugiere que FABPs tienen diversos y altamente específicos sus papeles en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos. Recientemente, múltiples evidencias sugiere que A-FABP circula en el torrente sanguíneo humano, y se ha correlacionado estrechamente con la obesidad y la diabetes tipo 2 (Shi et al. 2012). Algunos autores han descrito que FABP4 es altamente expresada en adipocitos maduros, aunque también se encuentra circulando en el plasma (Aragón et al. 2012). Se ha relacionado un incremento de los niveles de FABP4 con perfiles lipídicos anormales y resistencia a la insulina, presente en patologías tales como la obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2 e hiperlipidemia familiar combinada o síndrome de lipodistrofia. Asimismo se ha descrito que FABP4 tiene capacidad para modular la señalización de la insulina en las células vasculares mediante una disminución de la actividad de eNOS y la producción de NO, favoreciendo una disfunción endotelial (Aragón et al. 2012). Además, el aumento de FABP4 se ha asociado significativamente con aumento del riesgo cardiovascular (Hong et al. 2011).

En general, se ha descrito que los ácidos grasos son biomoléculas compuestas por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud o número de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo (R-COOH, R es la cadena hidrocarbonada que identifica al ácido en particular). La gran mayoría de los ácidos grasos pueden ser sintetizados por el organismo, sin embargo los ácidos grasos esenciales son aquellos ácidos grasos que no pueden ser sintetizados, como α -linolénico (18:3 ω -3) y el linoleico (18:2 ω -6), los cuales son de tipo poliinsaturados que deben obtenerse por medio de la dieta (Shen et al. 2014). A partir de estos ácidos grasos esenciales, las células humanas puede generar otros ácidos grasos a través de diferentes vías metabólicas (Figura 2.18).

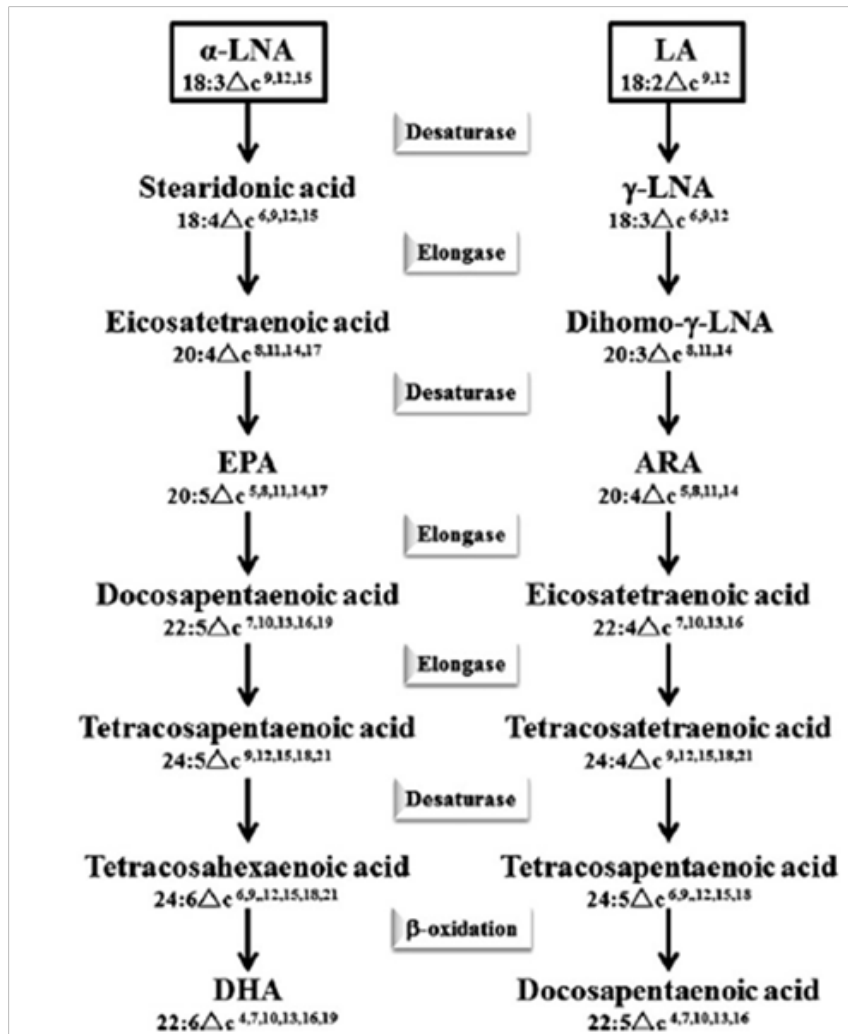


Figura 2.18. Metabolismo de los ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6. A través de diferentes procesos de elongación y desaturación se generan a partir de α-LNA (ácido α-linolénico) y LA (ácido linoleico). Otros ácidos grasos con importancia biológica como el ácido araquidónico (ARA) que está presente en las membranas de las células, y es el precursor de eicosanoides; el ácido decosaheptaenoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA) necesarios para el crecimiento, también se han relacionado con una disminución de la prevalencia de enfermedades cardíacas y cáncer. Figura adaptada de (Ibarguren et al. 2014).

Los ácidos grasos de la dieta son esenciales para el crecimiento normal, el desarrollo, y una serie de funciones importantes. Los ácidos grasos y sus derivados pueden mediar eventos celulares críticos, incluyendo la activación y expresión de genes, y la regulación de la señalización celular; un desbalance entre su metabolismo y la síntesis o ingesta de los ácidos grasos puede estar relacionado con diversas patologías, incluyendo el síndrome metabólico (Mayneris-Perxachs et al. 2014a; Mayneris-Perxachs et al. 2014b). Un mejor conocimiento de los mecanismos por los cuales los ácidos grasos ejercen sus efectos biológicos es importante en el descubrimiento de la patogénesis de estos trastornos (Ibarguren et al. 2014).

Los ácidos grasos pueden clasificarse como saturados (SFA), también llamados grasas trans, con un efecto negativo, e insaturados, que a su vez se clasifican en monosaturados (MUFA) y polinsaturados (PUFA), con efectos beneficiosos a nivel cardíaco (Baum et al. 2012). El SFA más común en la naturaleza es el ácido palmítico, en tanto que las PUFAs más comunes son los derivados de los ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6. El grupo de los omega-9 incluye

tanto ácidos grasos tipo PUFAs como MUFAs, aunque el más ampliamente encontrado es el ácido oleico, parte fundamental de la dieta mediterránea.

En 2010, la UNESCO reconoció la dieta mediterránea como Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad. Este patrón de dieta se caracteriza por un alto consumo de alimentos de origen vegetal, un alto consumo de aceite de oliva, enriquecidos en omega-9 OA (C18: 1Δc9), el consumo de pescado moderado, baja o moderada la ingesta de productos lácteos, bajo consumo de carne y el consumo de vino en cantidades moderadas durante las comidas (Ibarguren et al. 2014). Varios estudios en voluntarios con dieta mediterránea han llegado a la conclusión que este tipo de dieta favorece un aumento de los ácidos grasos MUFAs en relación con los SFA, que conlleva a una reducción de la presión arterial, incluso llegando a aumentar la capacidad cognitiva; estos efectos beneficiosos están directamente relacionados a la ingesta de ácido oleico (Samieri et al. 2013; Mayneris-Perxachs et al. 2014a).

El perfil de FA se puede utilizar como un indicador de riesgo para desarrollar síndrome metabólico, que se caracteriza por el aumento del contenido de FFA y un menor contenido de PUFA, con una alta proporción de ácido palmítico (PA, C16: 0) y ácido palmitoleico (POA, C16: 1n-7), que se han asociado con resistencia a la insulina y un mayor riesgo de desarrollar diabetes, obesidad, hipertrigliceridemia y enfermedades cardiovasculares (Choi et al. 2008; Oberbach et al. 2012). En general, se puede decir que los pacientes con síndrome metabólico presentan una proporción más elevada de SFA especialmente del ácido palmítico y una baja concentración de PUFAs. A continuación, se muestra una tabla extraída de un trabajo de PREDIMED donde se puede observar una proporción basal en porcentaje de los diferentes ácidos grasos en plasma entre sujetos sanos y sujetos diagnosticados de síndrome metabólico (Mayneris-Perxachs et al. 2014a).

Ácidos grasos libres en plasma		Sujetos Sanos	Sujetos Mets
SFA		28.7± 2.9	29.8 ± 3.0
MA (C14:0)		0.53 ± 0.24	0.64 ± 0.29
PA (C16:0)	Ácido palmítico	20.9 ± 1.9	21.9 ± 2.3
MGA (17:0)	Ácido margárico	0.29 ± 0.30	0.28 ± 0.35
SA (C18:0)	Ácido esteárico	6.82 ± 1.18	6.78 ± 1.17
MUFA		26.7 ± 0.3	27.8 ± 4.5
POA (C16:1n-7)	Ácido palmitolico	1.21 ± 0.64	1.40 ± 0.64
OA (C18:1n-9)	Ácido oleico	25.4 ± 4.1	26.3 ± 0.4
PUFA		43.0 ± 4.4	40.7 ± 6.0
Series n-6			
LA (C18:2n-6)	Ácido linoleico	30.2 ± 4.2	27.9 ± 5.3
GLA (C18: 3n-6)	Ácido gamma-linolénico	0.38 ± 0.20	0.41 ± 0.18
DGLA (C20: 3n-6)	Ácido dihomo- gamma-linolénico	1.48 ± 0.36	1.49 ± 0.35
AA (C20: 4n-6)	Ácido araquidónico	6.72 ± 1.63	6.67 ± 1.75
Series n-3			
ALA (C18: 3n-3)	α-linolénico	0.32 ± 0.16	0.33 ± 0.15
EPA(C20: 5n-3)	Eicosapentanoico	0.73 ± 0.82	0.72 ± 0.70
DHA (C22: 6n-3)	Decosahexaenoio	2.36 ± 0.91	2.44 ± 0.84

Tabla 2.4. Composición de los ácidos grasos en sujetos con o sin síndrome metabólico bajo dieta mediterránea independiente del género. Valores expresados en porcentaje del total de ácidos grasos libres circulantes basales de 427 sujetos, de los cuales 315 cumplían con los criterios de inclusión dentro del síndrome metabólico y 112 fueron sujetos sanos. Abreviaturas; Mets: con síndrome metabólico; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos polinsaturados (Mayneris-Perxachs et al. 2014a).

2.6.2. Implicación de los ácidos grasos en la obesidad, citotoxicidad y resistencia a la insulina

Los aumentos fisiológicos en los niveles de los FFA en plasma causan resistencia a la insulina tanto en sujetos diabéticos y no diabéticos mediante la producción de varios defectos metabólicos: (1) los FFA inhiben la captación de glucosa inducida por insulina, a nivel del transporte de glucosa o inhibiendo la fosforilación (o ambos); (2) Los FFA inhiben la síntesis de glucógeno estimulada por insulina; y (3) los FFA inhiben la oxidación de la glucosa estimulada por la insulina. Los FFA probablemente también causan resistencia a la insulina hepática, lo que resulta en aumento de las tasas de producción de glucosa endógena en relación con el grado predominante de la hiperinsulinemia. Por último, el aumento entre 30-50% de los FFA en plasma aumenta la secreción de insulina basal y potencian la secreción de insulina estimulada por glucosa en ajus-

tes a corto plazo y largo plazo. La acción estimulante de los FFA en las células β permite a las personas obesas que no tienen una predisposición genética a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 compensar su resistencia a la insulina con un aumento en la secreción de insulina mediada por los FFA. Por el contrario, los sujetos que están genéticamente predispuestos a desarrollar diabetes tipo 2 son incapaces de secretar suficiente cantidad de insulina para compensar su resistencia a la insulina inducida por los FFA. Esta situación dará lugar a un aumento en la concentración de glucosa en la sangre y, finalmente, a la diabetes tipo 2 (Boden 2001).

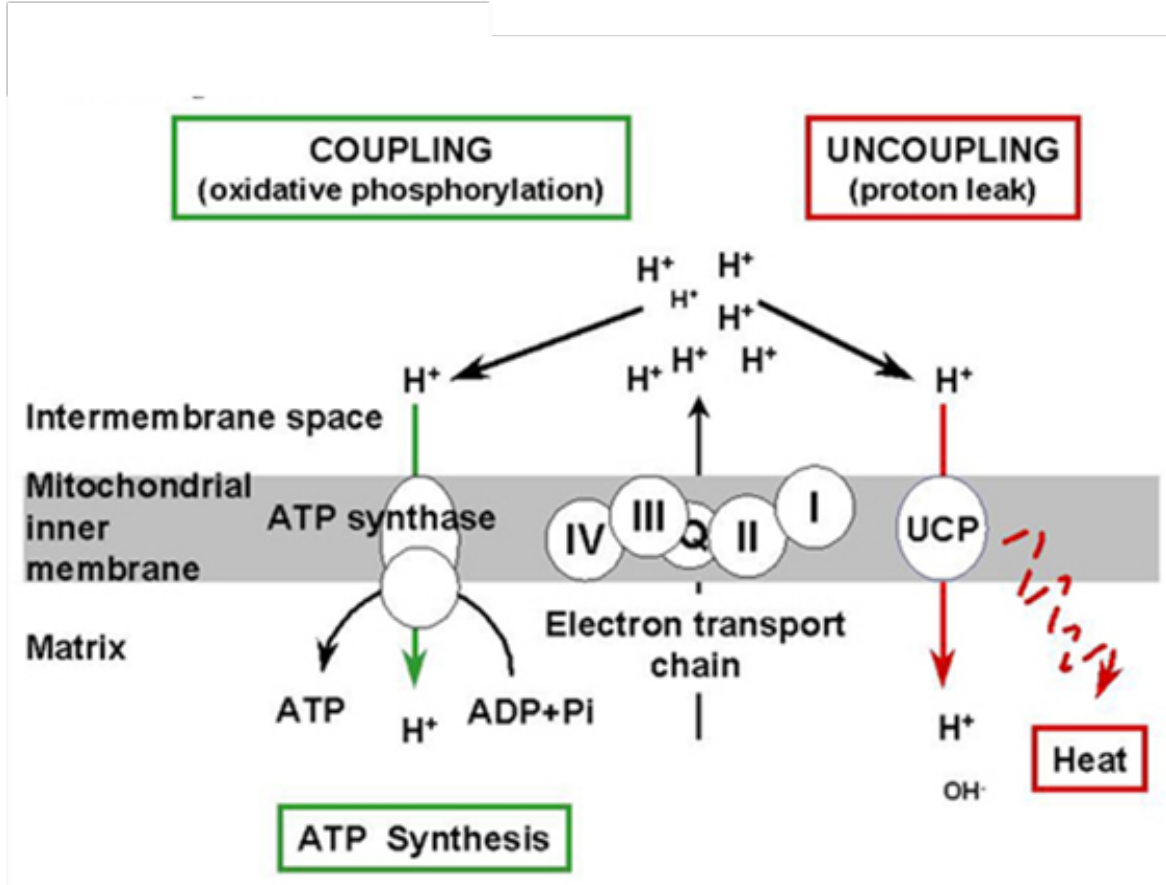


Figura 2.19. Ubicación y función de las UCPs en la cadena respiratoria mitocondrial (MRC). Números I-IV corresponde a los complejos de MRC. ATP-sintasa es el quinto complejo de la MRC. Durante la respiración, los protones son bombeados a través de los complejos de MRC, y se genera un gradiente de protones. La energía del gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP por el complejo ATP-sintasa. Las UCPs catalizan nuevamente la entrada regulada de protones en la matriz, desacoplamiento la MRC y, en consecuencia, la reducción de la síntesis de ATP, con generación de calor.

3 OBJETIVOS

Una de las principales causas de mortalidad en los países desarrollados y muy en especial en la población diabética, son las enfermedades cardiovasculares (S. M. Haffner et al. 1998). Uno de los procesos común en todos ellos es el desarrollo de las placas ateroscleróticas. En las fases iniciales, cuando se está produciendo la estenosis del vaso y el crecimiento de la placa, uno de los mecanismos que contribuyen al mismo, es la migración de las células de músculo liso vascular residentes de la capa media a la íntima y la proliferación de las mismas. En esta tesis, nos planteamos como primer objetivo profundizar en los mecanismos que pudieran estar contribuyendo a dicha proliferación. En este sentido, pretendíamos estudiar el papel concreto de las isoformas del receptor de la insulina y del IGF-1R en dicho proceso, ya que en otras patologías, como el cáncer o la hiperplasia pancreática se había demostrado que puede modificarse el perfil de las isoformas del IR y como en concreto, la isoforma A del IR pudiera estar confiriendo una ventaja proliferativa a dichas células (Escribano et al. 2009; Denley et al. 2003).

Por otro lado, en esta tesis también nos planteamos mecanismos protectores frente al daño vascular. En primer lugar, quisimos profundizar en las acciones antiaterogénicas ya demostradas de UCP-2 (Blanc et al. 2003; Kim et al. 2007), y en concreto, estudiar el efecto antagónico del TNF- α y la insulina en la modulación de UCP-2 y el daño vascular que era completamente desconocida. En segundo lugar, profundizar en los efectos cardioprotectores del ácido oleico, como uno de los componentes más importantes del aceite de oliva virgen, que se ha demostrado recientemente de forma inequívoca en estudios de gran relevancia como el PREDIMED (Estruch et al. 2013; Mayneris-Perxachs et al. 2014a).

Por estas razones, en esta tesis se plantearon como objetivos específicos:

- 1)** Estudiar el papel de las isoformas del IR y del IGF-1R en la proliferación de las células de músculo liso vascular y su implicación en el crecimiento de la placa aterosclerótica.
- 2)** Estudiar nuevos mecanismos que ayuden a explicar si la moderada hiperinsulinemia o los niveles bajos de TNF- α podrían tener un papel protector frente al daño vascular mediado por UCP-2.
- 3)** Estudiar el papel protector del ácido oleico en la resistencia a la insulina cardiovascular, el inicio, desarrollo e inestabilidad de la placa aterosclerótica.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

In vivo

4.1. Experimentación animal

Para la realización de esta tesis se utilizaron los siguientes animales : 1) ratones de tipo silvestre, 2) ratones con el exón 4 del receptor de insulina (IR) flanqueado por las secuencias loxP (loxP/loxP), 3) los ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de UCP-1 (UCP-1- Cre), 4) ratones con una delección del IR específicamente en el tejido adiposo marrón (BATIRKO), y 5) ratones con delección en el gen para apolipoproteína E (ApoE^{-/-}).

Fueron mantenidos bajo condiciones estándar; ciclo de luz-oscuridad (12 horas cada uno), temperatura (23,3° C) y humedad (65,1 %). La manipulación animal se realizó siempre entre 9:30 am -12:30p.m. . Las condiciones para el manejo de los animales en el laboratorio estaban de acuerdo con la Directiva Europea del Consejo Nacional de Investigación 86/609 CEE. Igualmente, durante la manipulación se dio cumplimiento a las sugerencias de la Comisión de Ética de la Universidad Complutense de Madrid. La investigación también se ajusta a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH Publication No. 85-23, revisado 1996).

4.2. Generación y caracterización génica de los modelos animales

4.2.1. Sistema Cre-recombinasa

El sistema Cre/loxP recombinasa es una tecnología específica de sitio, permite flanquear el gen diana un tejido específico con secuencias loxP introducidas mediante recombinación homóloga. La secuencia loxP (locus de X-over P1) se derivan de bacteriófago P1, es un sitio en el bacteriófago P1 que consta de 34 pb. Estos sitios contienen elementos de unión específicos para Cre que rodean una secuencia direccional principal donde la nueva recombinación puede ocurrir. La proteína Cre recombinasa tiene 38 kDa, esta está implicada en la recombinación específica entre los sitios loxP. Cuando las células que tienen dichas secuencias en su genoma expresan Cre, eliminando el gen por recombinación homóloga (Sauer 1993).

4.2.2. Ratones UCP-1 Cre

Para la generación de ratones con una delección específica de IR en el BAT, nuestro grupo construyó un vector transgénico UCP-1-Cre (Guerra et al. 2001). En el constructo se utilizó como

promotor del gen UCP- 1 para dirigir la expresión de la recombinasa Cre, la regulación noradrenérgica, y obtener un alto nivel de expresión, puesto que UCP-1 se expresa casi exclusivamente en BAT y minoritariamente está presente en tejidos con depósitos de grasa marrón o beige (Nibbelink et al. 2001; Ishibashi & Seale 2010).

El ADN lineal del plásmido se microinyectó en cigotos pronúcleo FVB/NJ del Jackson Laboratory (Guerra et al. 2001). Para distinguir los ratones que habían integrado la secuencia la UCP-1-Cre/+ de los que no se habían integrado, el genotipo fue verificado por secuenciación mediante qRT-PCR del ADN obtenido a partir de la cola del ratón.

4.2.3. Ratones IR loxP/loxP

Ratones IR loxP/loxP tienen el exón 4 del gen IR flanqueado por secuencias loxP. Proviene del 129sv linaje transgénico C57BL/6 y ratones FVB/NJ, obtenidos de cruces de ratones heterocigotos loxP/+. Mediante la expresión del sistema Cre-recombinasa se puede inactivar el gen flanqueado por las secuencias loxP.

4.2.4. Ratón BATIRKO: carente del receptor de la insulina específicamente en el tejido adiposo marrón

El ratón deficiente del IR específico en tejido adiposo marrón (BATIRKO) se generó a partir de los cruces sucesivos del ratón transgénico de UCP-1-Cre e IR loxP/loxP. Obteniéndose así, ratones IR loxP/loxP -UCP-1-Cre que presentaron una delección específica del IR en el tejido adiposo marrón, en tanto que en otros tejidos, este receptor no se afectó (Guerra et al. 2001) (caracterización génica Tabla 4.1.).

Los ratones fueron destetados a las cuatro semanas de edad. Se cortó una pequeña porción de la cola para obtener ADN con el cual se realizó la caracterización génica.

4.2.5. ApoE -/- ratones

El modelo animal de ratones C57BL/6 carentes del gen que codifica para la apolipoproteína E (ApoE-/-), se adquirió del Charles River laboratorio; el nombre original ApoE (JAX™ Mice Strain Apoetm1Unc mutante). Éste ha sido el modelo clásico de la investigación cardiovascular porque desarrollan hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia y lesiones ateroscleróticas similares a las humanas de forma espontánea o bajo dieta grasa (Zhang et al. 1992).

4.3. Caracterización génica de los modelos animales

Para la digestión, las colas fueran incubadas a 55 ° C durante toda la noche en con 300µl de tampón de digestión, el cual contenía tris HCl pH 8,0 (50 mM), EDTA pH 8,0 (25 mM), NaCl (100 mM), dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 % (p/v) y proteinasa K (20mg/ml). A la mañana siguiente, se añadió 300µl de fenol saturado con un tampón Tris - EDTA (TE) pH 8,0 (10 mM de Tris pH 8,0 - 1 mM EDTA pH 8,0) y se agitó la mezcla durante 30-60 segundos en un agitador electrónico Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12.000 rpm durante cuatro minutos. Se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo. Se añadió 300µl de mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Por último, se centrifugó durante tres minutos a 12.000 rpm.

Por el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR), se amplificó el ADN para determinar el genotipo de los ratones. La RT-PCR se realizó con 150 ng de ADN, usando los cebadores descritas en la (Tabla 4.1.).

Genotipo	Secuencia del Oligonucleótidos Sentido (S) antisentido (AS)	Tm No. Ciclos
<i>loxP/loxP</i>	(S) 5' CCTAAGGTCTGCCAAATC 3' (AS) 5' TTAAAGCAATCCTCCTCCTGCCTCAGCCT 3'	57° C 30 ciclos
UCP-1-Cre	UCP-1 (S) 5' GTCTGCACTGGCACTACCTA 3' UCP-1 (AS) 5'GGAGAAGCCTCATCAATGTCA 3' Cre (AS) 5' CCATCGCTCGACCAGTTTAGT 3'	54° C 32 ciclos
ApoE E ^{-/-}	(S) 5' GTCTGCACTGGCACTACCTA 3' (AS) 5'GGAGAAGCCTCATCAATGTCA	60 ° C 30 ciclos

Tabla 4.1 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la caracterización génica: los modelos animales utilizados durante el estudio se caracterizaron por RT-PCR.

Una vez amplificado el ADN, por las qRT-PCR anteriores se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% por cada uno y se obtuvieron patrones distintos dependiendo del fenotipo animal (interpretación en tabla 4.2.). Para la verificación de la presencia de las secuencias *loxP/loxP* el producto de la qRT-PCR fue resuelto en gel de agarosa, donde se pudo observar la presencia de tres diferentes fenotipos; el *loxP/loxP* en cual aparece una banda de 320 pares de bases (pb); el *loxP/+* presenta dos bandas, una de 320 y otra de 280 pb; y *+/+* una sola banda de 280 pb. El producto de la qRT-PCR de UCP-1-Cre presentó dos bandas; la primera de las bandas amplifica la Cre-recombinasa bajo el promotor de UCP-1 y la segunda banda corresponde a una región interna de dicho promotor. Por lo cual, tanto en el ratón BATIRKO como en el UCP-1-Cre aparecieron dos bandas de 600pb y 300pb que indican la presencia de UCP-1-Cre. Los ratones silvestres e IR *loxP/loxP* sólo presentaron una única banda de 300pb que corresponde con la región interna del promotor de UCP-1.

Fenotipo de los animales	RT - PCR		
	<i>Loxp/Loxp</i>	UCP-1 Cre	ApoE ^{-/-}
Tipo silvestre	<i>+/+</i>	300 pb	<i>+/+</i>
UCP-1-Cre	<i>+/+</i>	600 pb 300 pb	<i>+/+</i>
<i>loxP/+</i>	<i>loxP/+</i>	Sin amplificación	<i>+/+</i>
IR <i>loxP/loxP</i>	<i>+/+</i>	300 pb	<i>+/+</i>
BATIRKO	<i>loxP/loxP</i>	600 pb 300 pb	<i>+/+</i>
ApoE E ^{-/-}	<i>+/+</i>	Sin amplificación	<i>-/-</i>

Tabla 4.2. La interpretación del fenotipo animal. A partir de los productos de qRT-PCR resueltos por electroforesis se obtuvo el fenotipo de las animales.

4.4. Diseños de experimentación y tratamientos

4.4.1. BATIRKO 33 semanas: dieta estándar y dieta alta en grasa.

En uno de los modelos utilizados en esta tesis, se pretendía generar resistencia a la insulina en el modelo BATIRKO y para ello le sometimos a dieta grasa para generar obesidad. Por tanto, llevamos un grupo control que recibió dieta estándar (STD), una dieta de mantenimiento estándar específica para roedores (Panlab A04). La ingesta de energía fue de 2,9 kcal/g. La dieta estaba compuesta por el 16% de proteínas, 3% de lípidos, 60% de carbohidratos, 12% de agua, 5% de cenizas y minerales y 4% de fibras.

Además, había otros dos grupos, Control y BATIRKO que recibieron dieta alta en grasas (HFD), hipercalórica, a partir de la semana 17, durante 16 semanas. La ingesta de energía fue de 5,2 kcal/g. Era una dieta a base de grasa (Panlab A04), pero enriquecida con 18% de manteca de cacao y el 15% de colesterol.

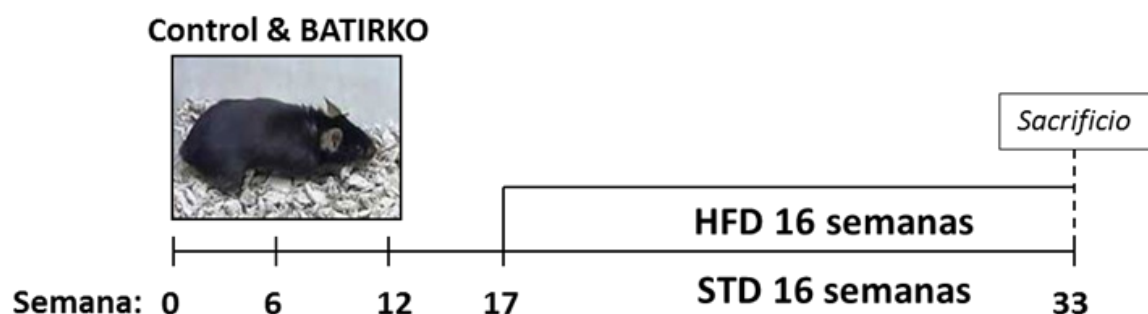


Figura 4.1. BATIRKO 33 semanas: dieta estándar y dieta alta en grasa.

4.4.2. BATIRKO de 52 semanas de edad sometidos a dieta estándar

El modelo BATIRKO de 52 semanas (BATIRKO 52 S) sometido a dieta estándar, es un modelo animal que desarrolla susceptibilidad a la obesidad, presentado un aumento de la adiposidad visceral, que presenta un deterioro en la señalización de la insulina en el WAT y en la arteria aorta y disfunción vascular. Una posible causa de dichas alteraciones vasculares es la secreción concertada de adipocitoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α por ambos tejidos adiposos. Por este motivo, nos planteamos tener un tercer grupo en este modelo que era ratones BATIRKO tratados con 50 μ g/mouse LEAF™ Purified anti-mouse TNF- α (MP6-XT22, Biolegend, San Diego, CA), cada 3 días durante las últimas seis semanas del estudio (Gómez-Hernández et al. 2012).

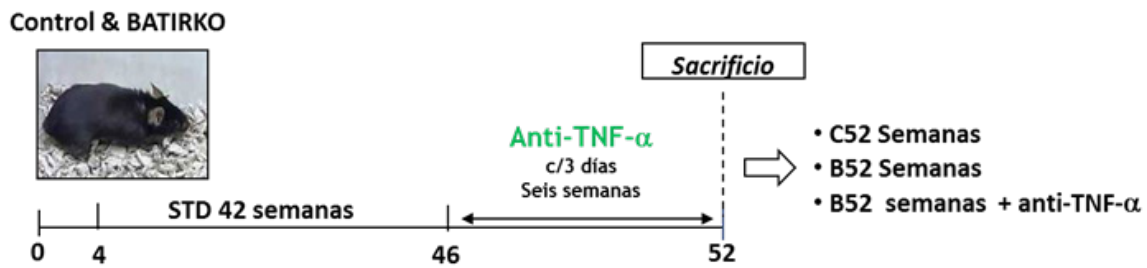


Figura 4.2. BATIRKO de 52 semanas de edad sometidos a dieta estándar

4.4.3. Ratones con delección de la apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) bajo dieta occidental

ApoE^{-/-} ratones fueron alimentados con dieta estándar durante dos semanas. A las 6 semanas de edad fueron alimentados con una dieta de tipo occidental, que tenía un 21% kcal por la grasa durante 2, 6, 12 ó 18 semanas. Obteniéndose cuatro grupos de ratones ApoE^{-/-} de 8, 12, 18 y 24 semanas de edad y sus respectivos grupos controles de ratones silvestres de las mismas semanas.

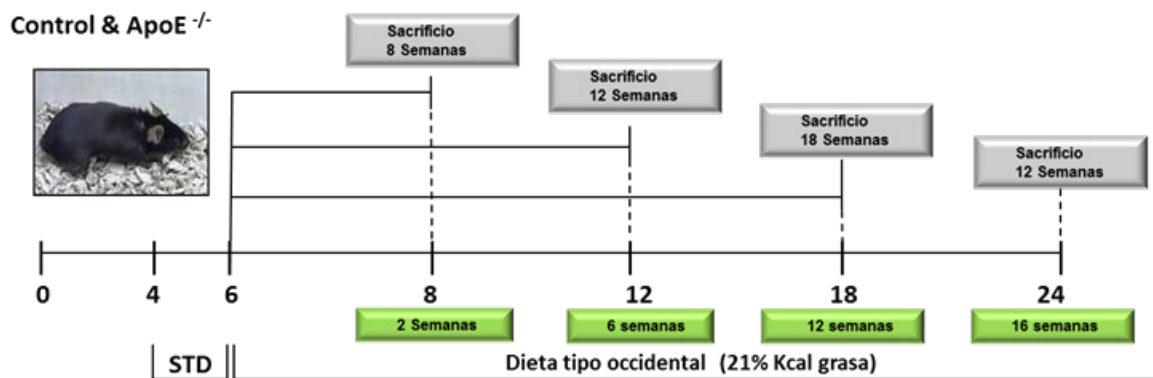


Figura 4.3. Ratones knockout apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) bajo dieta occidental

4.5. Técnica utilizada en modelos animales

4.5.1. Test de tolerancia a la glucosa

La prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) sirve para determinar la rapidez con la que el cuerpo metaboliza la glucosa en sangre, esta se realizó a los diferentes modelos animales estudiados. Con el fin de conocer los niveles de la glucemia basal, se ayunó a los ratones durante toda la noche. Mediante una pequeña muestra de sangre tomada de la cola, se midió la glucosa. Tras la

inyección de glucosa intraperitoneal, la glucemia medida fue considerada como “tiempo cero”. Posteriormente, la glucemia fue medida nuevamente a los 30, 60 y 120 minutos. La glucosa inyectada fue calculada para cada animal mediante la razón de peso corporal 2g glucosa/kg peso corporal.

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

4.5.2. Test de tolerancia a la insulina

Para estudiar la tolerancia a la acción de la insulina de los ratones, se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la insulina (ITT). Las inyecciones de insulina inducen hipoglucemia, como respuesta a esto la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona de crecimiento (GH) son liberados como parte del mecanismo de estrés, por lo cual la ITT es el estándar de oro para evaluar la integridad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal. La realización de ITT permite evaluar la capacidad de organismo para incorporar la glucosa en sangre a las células, midiendo la glucemia. Esta prueba se llevó a cabo en ratones sin ayunar, es decir, la concentración de glucosa en sangre inicial es postprandial. Se inyectó 1U/kg de peso corporal de insulina humana (NovoNordisk) intraperitonealmente, considerándose el “tiempo cero”. Se realizaron medidas de glucemia a los 0, 15, 30 y 60 minutos tras la inyección.

Se considera que el animal tiene una respuesta normal a la acción de la insulina, si después de la administración de la insulina, hay un descenso de la concentración de glucosa en sangre que se va recuperando en el tiempo. Los resultados se expresaron como porcentaje de concentración inicial de glucosa en sangre.

4.5.3. Señalización de la insulina in vivo

Se realizaron estudios de señalización de la insulina in vivo. Este tipo de estudios permiten conocer el estado de la ruta de señalización de la insulina en el animal, y comprobar de forma individual su respuesta en cada órgano. Para su realización, se inyectó 1U/kg de peso corporal de insulina humana (NovoNordisk) intraperitonealmente en ratones sin ayunar, 5 minutos después se procedió al sacrificio del animal y se extrajeron todos los tejidos necesarios.

4.5.4. Determinación de los perfiles metabólico y lipídico

Las mediciones de insulina se realizaron en plasma de los ratones ayunados 24 horas mediante kit de ELISA (Millipore). Las concentraciones de leptina, adiponectina (Millipore) y TNF- α (SABioSciences), se midieron mediante kits de ELISA en el plasma obtenido de los ratones.

EL perfil lipídico son un grupo de pruebas para determinar el estado del metabolismo de los lípidos corporales. Las pruebas que se incluyen en un perfil lipídico son; triglicéridos (TG), colesterol total (CH), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Se determinó niveles de CH, TG y las fracciones LDL y HDL del colesterol, en el plasma de los animales, para ello se utilizaron métodos colorimétricos siguiendo instrucciones de la casa Spinreact.

4.5.5. Determinación de la acumulación de lípidos del tejido

Para visualizar los depósitos de lípidos en tejidos, de animales sometidos a los diferentes diseños experimentales, se realizaron cortes de arco aórtico, corazón, músculo esquelético e hígado, procedentes de tejidos incluidos en Tomografía de coherencia óptica (OCT). Esta técnica OCT se utiliza para incluir muestras de tejidos antes de ser seccionados en frío en un criostato, con el fin de montar láminas de 7-15 μ m de una muestra en portaobjetos para su análisis. Después de realizar los cortes, estos se fijaron con una solución de formaldehído 4%, se tiñeron con Oil-Red-O (0.06%); El Oil-Red es un colorante que tiñe triglicéridos neutros y lípidos con un máximo de absorción a 518 (359) nm, y finalmente, los cortes se contrastaron con hematoxilina, para visualizar los núcleos.

4.5.6. Reactividad vascular

La función vascular se estudió en anillos de la arteria aorta torácica al final de los diferentes tratamientos en todos los diseños experimentales. Se aisló la aorta torácica, se limpió del tejido adyacente y se colocó en una solución de Krebs NaCl (118,5 mM), KCl (4,7 mM), CaCl₂ (2,8 mM), KH₂PO₄ (1,1 mM), NaHCO₃ (25 mM), glucosa oxigenada (11,1 mM) (95% O₂ – 5%CO₂) a 4°C. (De las Heras N. et al 2003).

Posteriormente, se cortó la aorta torácica en segmentos de aproximadamente 2mm de ancho. Cada anillo se colocó en una copa con 5ml de tampón Krebs gaseado a 37°C y suspendido entre dos ganchos de acero con forma de L. El gancho superior se ancló a un transductor de fuerza (FT03, Grass) acoplado a un sistema computerizado (Mc Lab 8E, AD Instruments) para medir la tensión isométrica. Los anillos se equilibraron durante 60 ó 90 minutos hasta que dejó de fluctuar, cambiando el tampón cada 15 minutos. Se realizaron varios ajustes de longitud hasta que se encontró que a 1g se obtenía la tensión basal óptima para este tipo de experimentos. Una vez se estabilizó la tensión, se comenzaron los experimentos.

Se midió la respuesta contráctil conseguida con KCl (120 mM). Esto se debe a que el KCl activa los canales de potasio dependientes de voltaje de forma independiente, de este. La función endotelial se estudió evaluando las relajaciones dependientes de endotelio a la acción de la acetilcolina (ACh) en concentraciones crecientes desde 10⁻⁹ a 10⁻⁵ M.

Adicionalmente, se midió la relajación independiente de endotelio inducidas por nitroprusiato de sodio en concentraciones crecientes desde 10⁻¹⁰ a 10⁻⁷ M en anillos aórticos pre-contráidos con fenilefrina a una concentración de 10⁻⁶M. El nitroprusiato causa relajación del músculo liso, actuando como un donador de óxido nítrico, por lo que su acción vasodilatadora está mediada por la activación de la guanilciclasa y la formación de GMP cíclico. Asimismo, se analizó la respuesta contráctil a angiotensina II a una concentración de 10⁻⁶ M y al análogo de tromboxano A₂ (U46619), el cual es un vasoconstrictor que imita el efecto hidrosmótico de la vasopresina, en un rango de concentraciones desde 10⁻⁹ a 10⁻⁶M. Las contracciones se expresaron como porcentaje respecto a la concentración máxima alcanzada por el KCl.

4.5.7. Determinación del anión superóxido en la aorta

La determinación del anión superóxido *in situ* (O_2^-), es un método que proporciona una detección muy sensible del O_2^- en el propio tejido. El anión superóxido tiene una función importante *in vivo*, ya que participa en la descarga respiratoria (aumento súbito del consumo de oxígeno) de las células fagocíticas activadas por contacto con partículas extrañas en los eventos inmunológicos (Cita). Se utilizó hidroetidina (HE) para la determinación de la concentración O_2^- en la aorta. Las células son permeables a la hidroetidina (HE), que es un colorante oxidativo fluorescente en presencia de O_2^- ; la HE se oxida a bromuro de etidio fluorescente, de tal manera que queda retenido en las células debido a su capacidad intercalante en el DNA. Para llevar a cabo esta técnica, se utilizaron secciones aórticas de 25 μ m de grosor, colocadas sobre un portaobjetos de cristal. Se aplicó HE a concentración 2×10^{-6} M en cada sección. Se cubrieron y se incubaron en una cámara oscura humidificada, a 37°C durante 30min. La intensidad y localización de la HE oxidada, refleja la producción de anión superóxido que se observó en microscopio de fluorescencia (excitación a 480nm y emisión a 610nm).

En presencia de estos aniones, el óxido nítrico puede generar peroxinitrito, que es un potente agente oxidante y nitrante de las especies reactivas de nitrógeno (RNS). Estas RNS, pueden provocar la oxidación y nitración de la tirosina. Por lo tanto, mediante inmunohistoquímica (ver apartado 1.12.2.), medimos las concentraciones de nitrotirosina en secciones aórticas, siendo una forma indirecta de la formación de O_2^- .

In vitro

4.6. Cultivo celular

4.6.1. Generación de líneas celulares y medios de cultivo

Se generaron líneas celulares de cardiomiocitos neonatales (CM), células de musculo liso vascular (VSMC) y células endoteliales aórticas (MAEC), a partir de ratones C57BL/6 con el receptor de insulina flanqueado por secuencias loxP/loxP y ratones de tipo silvestre (WT).

Para el trabajo en cultivos celulares se guardaron máximas condiciones de esterilidad. Todos los medios de cultivo y suplementos fueron obtenidos de Life Technologies, salvo excepciones indicadas. Todos los medios fueron suplementados con antibióticos: penicilina G (12 μ g/ml), estreptomycin (10 μ g/ml) y anfotericina B (0.25 μ g/ml).

Cada vez que los cultivos llegaban a confluencia se trataron con tripsina 0,25% y EDTA 0,02% a 37°C durante 3-5 minutos, tras el lavado de las mismas con Tampón fosfato salino (PBS). La tripsina es una enzima que permite levantar a las células adherentes de la placa al digerir proteínas que mantienen a las células unidas entre sí y a la placa, la digestión es parada mediante adición de medio completo con suero. Para detener la acción de la enzima, se añadió 2 ml de medio específico de cada línea celular.

Para la inmortalización de estas líneas celulares se utilizó el método previamente descrito por nuestro grupo en otras líneas celulares (Benito et al. 1993), mediante una infección con partículas virales codificando para el brazo largo del antígeno T (LTA_g) de SV40 (DeCaprio et al. 1988). Estas partículas virales se obtuvieron mediante transfección de células empaquetadoras con el plásmido pBABE-puro-LTA_g (forma K1 mutante, E107K) (Gjoerup et al. 2000).

La construcción pBABE-Puro-AgT con la secuencia del antígeno T del virus del poliovirus SV40 fue cedida por el Dr. J de Caprio, Dana Farber Cancer Institute, Boston, EEUU). A partir de las células generadas que contenían secuencias loxP/loxP, tanto de CM como de VSMC, se obtuvieron diferentes líneas celulares; Mediante una infección con partículas adenovirales (Ad-CMV-Cre, Vector Biolabs) se consiguió la supresión del IR, consiguiendo así las (IR-/-).

Igualmente, las MAEC fueron infectadas con Ad-CMV-Cre, aunque estas células no presentaron sensibilidad a la infección con Ad-CMV-Cre, por lo que no fue posible la delección del IR, en este tipo celular.

Las células que sobreexpresan la isoforma A (Rec A) y la isoforma (RecB) del receptor de la insulina humana, se obtuvieron tras la infección con partículas retrovirales pBABE-RecA y pBABE-RecB.

4.6.2. Cardiomiocitos neonatales

Esta línea celular fue generada en nuestro grupo en años anteriores por Otero FY. Para la obtención de cardiomiocitos neonatales, se sacrificaron ratones neonatos de un día de vida mediante decapitación y se extrajo el corazón. Este fue disgregado con Colagenasa tipo 2, 1,2 mg/ml (Worthington) y ADNasa 10 µg/ml (DNAsa I grado II, Roche) a 37°C durante 20 minutos. Para detener la reacción enzimática se tomó el sobrenadante, se agregó 5 ml de suero fetal bovino (FBS) y se centrifugó a 1000 rpm y 4°C. Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células del precipitado en medio de cultivo de cardiomiocitos primario; Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alto en glucosa (Life Technologies), FBS (5%), HS (10%), HEPES (20 mM), cardiotrofina-I (R&D Systems 0.2 ng/ml), insulina de (1µM de) y una mezcla de antibióticos y antifúngicos, anteriormente descritos. (Otero, YF 2010 tesis doctoral). Las células fueron sembradas en platos previamente tratados con colágeno tipo I (Collagen from rat tail, Roche Applied Sciences) disuelto en PBS al 0,2% de ácido acético, para así facilitar la adhesión de los cardiomiocitos.

4.6.3. Células de músculo liso vascular

Esta línea celular fue generada en nuestro grupo en años anteriores por Gómez-Hernández, A. Para obtener las VSMC se utilizaron ratones de 4-8 semanas de edad. Estos ratones se anestesiaron con Avertina® (12,5 mg de Tribromoethanol/ml, 250 mg/kg de peso del animal) de forma intraperitoneal. Una vez que comprobamos la ausencia de reflejos ocular y pedal, se procedió a extraer la arteria aorta torácica del animal utilizando material quirúrgico estéril. Se realizó una incisión para acceder a la cavidad torácica y se extrajo la aorta desde la zona abdominal hasta el arco aórtico.

Las aortas se colocaron en un tubo con PBS 1x estéril. A continuación, dentro de campana, se procedió a la eliminación tanto del tejido adiposo perivascular a la aorta, como de la capa adventicia de la misma. Con un bisturí estéril se dividieron las aortas en secciones lo más pequeñas po-

sibles, los cuales fueron digeridos con una mezcla de medio DMEM suplementado con HEPES (20 mM) y colagenasa II 4mg/ml en incubaron a 37°C durante 45-60 minutos. Transcurrido este tiempo se recogió el medio con los trozos de aorta y se centrifugaron a 900 rpm durante cuatro minutos. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio DMEM suplementado con 10% de FBS. El ciclo de centrifugación y resuspensión del precipitado se repitió tres veces más. Finalmente, el último precipitado fue resuspendido con medio y se sembró en placas. Este precipitado estaba compuesto de células de músculo liso de la pared vascular y explantes de aorta. Cuando se observó crecimiento celular a partir de los explantes, estos fueron retirados.

4.6.4. Cultivo de células endoteliales aórticas de ratón (MAECs)

Para la generación de estas células se eligieron ratones jóvenes de 3-4 semanas, los cuales fueron anestesiados con Avertina®. El sacrificio y la extracción de las aortas, se realizó de la forma anteriormente descrita para células VSMC. Con PBS frío se limpió la aorta de tejido adiposo y conectivo, y se fragmentó en anillos de 1-3 mm. Se llevaron a placas de 24 pocillos previamente tapizados con 0.3 ml de Matrigel BD (Dikinson), el cual se descongeló durante la noche a 4°C (McGuire & Orkin 1987; Kobayashi et al. 2005).

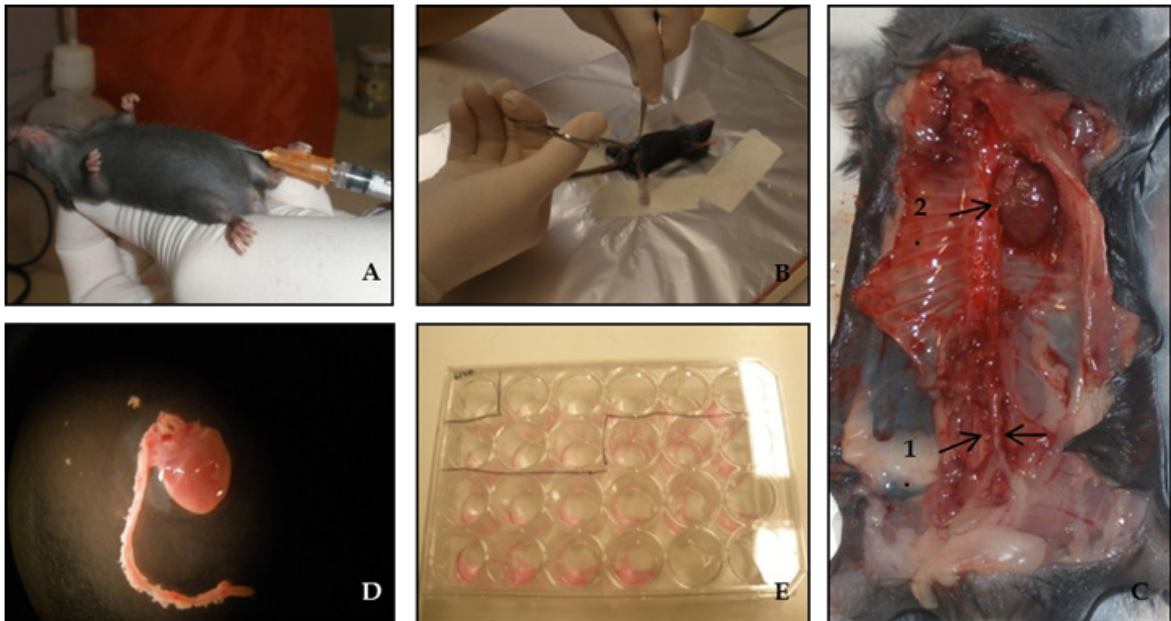


Figura 4.4. Aislamiento y obtención de los anillos aórticos. A. Inyección intraperitoneal de 1 ml de anestesia al ratón IR loxP/loxP. B. Incisión para acceder a la cavidad torácica. C. Extracción de la aorta desde la zona abdominal (1) hasta el arco aórtico (2). D. Limpieza de la aorta de tejido adiposo y conectivo en PBS-frío. Foto tomada con lente aumento 1X. E. Fragmentación de la aorta y siembra de los anillo aórticos en matrigel.

Tras depositar las secciones de anillos aórticos, se dejó solidificar el Matrigel a 37°C unos minutos y se agregó el medio de cultivo para células endoteliales, el cual es una adaptación de los protocolos utilizados por McGuire G y Kobayashi: DMEM, complementado con FBS (5%), HS descomplementada (10%), factor de crecimiento endotelial ECG (Sigma-Aldrich), heparina (12U/ml), HEPES (20mM), penicilina (12mg/ml), estreptomina (10 mg/ml) y anfotericina B (1%).

Los explantes fueron retirados entre el día 5-7 tras observarse crecimiento celular fuera de éstos, para reducir la posible contaminación con otros tipos celulares. Las células primarias obtenidas se dejaron crecer entre 5-10 días. Se disgregó la matriz de Matrigel (BD) con 0.2 ml de dispasa (BD) por cada cm² durante 1.5 horas a 37°C. La reacción se detuvo con EDTA 5mM y se lavaron varias veces con PBS. Finalmente se sembraron las células en placas multi-pocillo tapizadas con gelatina al 1% (Sigma-Aldrich) y el medio para células endoteliales anteriormente descrito. La solución de gelatina al 1% se preparó en agua ultrapura, se autoclavó y filtró. La gelatina al 1% se adicionó sobre el sustrato durante 2 horas, se retiró y se lavó con PBS (McGuire & Orkin 1987).

4.6.5. Cultivo de células endoteliales comerciales no aórticas

Se obtuvo una línea de células endoteliales no aórticas del ATCC (CRL-2167) de ratón. Estas células provienen del epitelio vascular de nodo linfático axilar de ratones C3H/HeJ. Estas células fueron immortalizadas con el antígeno T del SV40, presentan expresión de los antígenos para, receptores de alta afinidad para LDL, VCAM y el factor VIII de la coagulación, que se une a la glicoproteína denominada factor de Von Willebrand (vWF) mientras está inactivo en la circulación, ya que si no está unido a vWF se degrada rápidamente. Para el cultivo de las células CRL-2167 se utilizó el medio completo de crecimiento de La sociedad Americana de cultivos tipo (ATCC). El medio DMEM (ATCC) glucosa (4.5g/L) con L-glutamina (4mM) y ajustado con bicarbonato de sodio (1.5g/l) fue suplementado con HS inactivado (10%).

4.7. Infección con partículas virales

4.7.1. Generación de partículas retrovirales por transfección

Se utilizaron las células empaquetadoras Phoenix (Swift et al., 2001), para la generación de partículas retrovirales. La línea Phoenix derivan de las células HEK293T, expresando establemente los genes de la estructura retroviral en dos construcciones diferentes, gag-pol por un lado y env por otro, con el fin de minimizar riesgos de recombinación en retrovirus, generando posibles replicantes competentes.

Las células empaquetadoras fueron transfectadas con construcciones contenidas en el vector de expresión pBabe, el cual contiene elementos críticos para su función como vector retroviral. Estos son dos “long terminal repeats” (LTR), elementos implicados en la integración de la secuencia viral en el genoma diana; y una secuencia Psi, responsable del empaquetamiento del RNA viral en la cápside (Morgenstern et Land 1990). Se contó con dos tipos de vectores, p-Babe-puro y p-Babe-Hygro que confieren resistencia a los antibióticos puromicina e higromicina B, respectivamente (Figuras 4.5. y 4.6.).

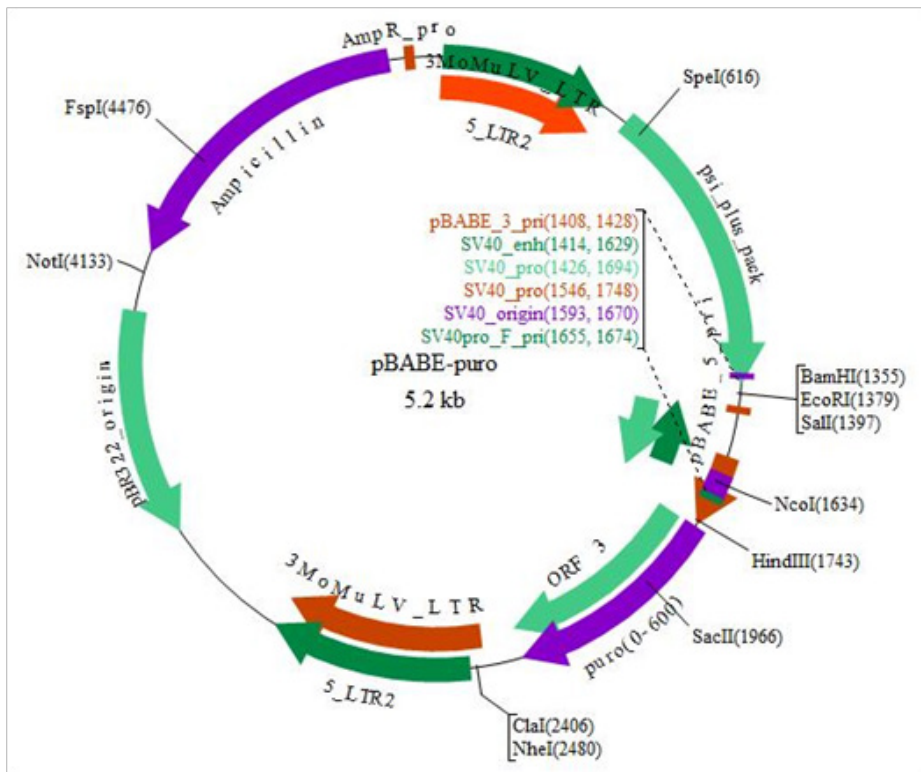


Figura 4.5 Esqueleto del vector: pBabe-puro. Marcador de selección es puromicina, tamaño esqueleto 5169(bp), utilizado para la generación de partículas retrovirus con el gen del AgT integrado.

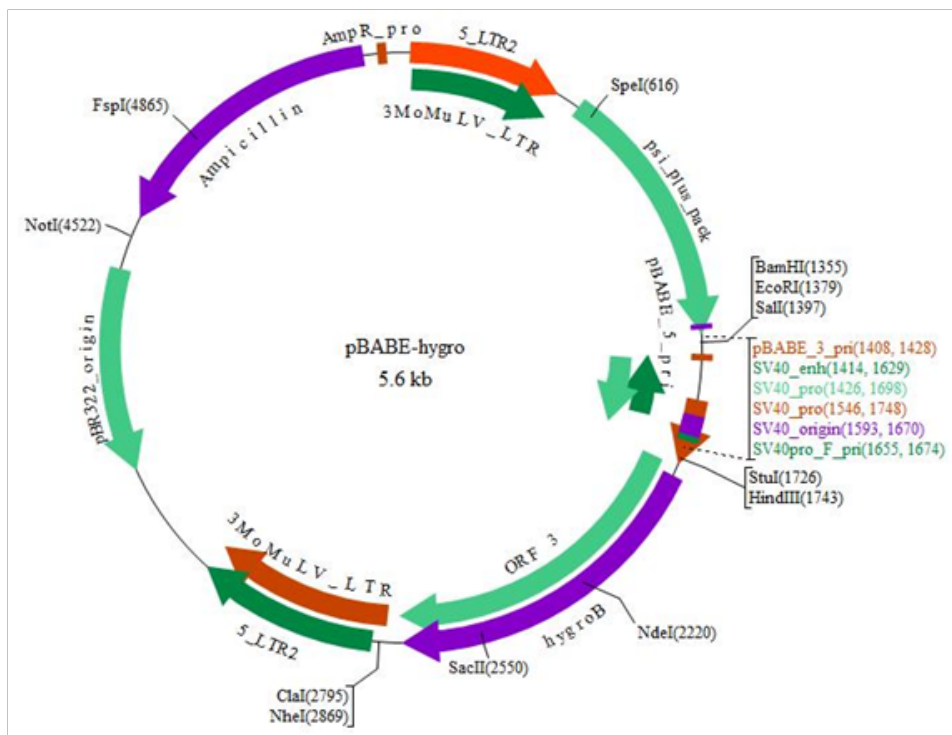


Figura 4.6. Esqueleto del vector: pBabe-hygro. Marcador de selección es puromicina, tamaño esqueleto 5558 (bp), utilizado para la generación de partículas retrovirus con el contrato RecA y RecB integrado.

Mediante los sistemas retrovirales, se consiguió integrar únicamente los genes de interés (gen clonado en vector y gen que confiere resistencia a antibióticos en mamíferos). El p-BABE-puro se utilizó para el constructo que contenía LAgT, utilizado para la inmortalización celular, y el vector p-BABE-hygro tanto en los constructos de reconstitución tanto de la isoforma A del IR (RecA) como de la isoforma B del IR (Rec B). Las construcciones retrovirales pBABE- hygro-IRA y pBaBE- hygro -IRB fueron amablemente cedidas por CR Kahn (Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston MA).

Para llevar a cabo la generación de partículas retrovirales las células Phoenix fueron tratadas con pases sucesivos con higromicina (300 µg/ml) durante una semana, para mejorar la expresión de gag, env y pol, siguiendo las recomendaciones del grupo que generó la línea Phoenix (Dr. Nolan, Stanford University, Stanford, EE.UU.) Posteriormente, se sembraron 4.5×10^6 células por placa de 100 mm con medio de transfección; DMEM alto en glucosa, enriquecido con glutamina (2 mM), FBS (10%), sin antibióticos. Al día siguiente, se cambió el medio a las células por 10 ml del medio fresco mencionado anteriormente. En un tubo, se diluyeron 60 µl del agente de transfección FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega) en 200µl medio. Ésta mezcla se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionó la dilución del ADN (7 µg) del vector utilizado pBABE-puro-AgT o pBABE-hygro (RecA o RecB) con el FuGENE® y se incubó durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la mezcla ADN- FuGENE®, se adicionó a las células. A las 24 h y 48 se recogió el medio condicionado, conteniendo las partículas virales generadas. Este medio con partículas se filtró con filtros de 0.45 µm para eliminar cualquier célula que hubiese podido quedar suspendida. Se hicieron alícuotas de las partículas virales las cuales fueron conservadas -80°C hasta su uso.

4.7.2. Inmortalización de las líneas celulares por infección partículas virales AgT

En el caso de las tres líneas celulares CM, VSMC y MAEC, se esperó hasta la estabilización del cultivo primario y un 70-80% de confluencia, antes de realizar la inmortalización con partículas retrovirales portadoras de la construcción pBABE-Puro-AgT.

La proteína del antígeno T del virus del poliovirus SV40, proporciona a las células la capacidad de propagarse indefinidamente y la inhibición del crecimiento celular por contacto tras alcanzar la confluencia. El SV40 suprime las propiedades transcripcionales del p53, supresor de tumores en humanos, a través del antígeno T grande y del antígeno T pequeño del SV40. p53 es responsable de iniciar la muerte celular o apoptosis y de la detención del ciclo celular cuando una célula es dañada. Un gen mutado p53 puede contribuir a la proliferación celular descontrolada.

La inmortalización se realizó con partículas retrovirales LTA_g en presencia de polibreno (8µg/ml) durante 72 horas, en medio DMEM sin aditivos. El polibreno es un polímero que favorece la entrada de las partículas retrovirales al interior de la célula. Transcurrido este tiempo, se crecieron en su medio normal, descrito anteriormente para cada una de las líneas. Posteriormente, se procedió a la selección con puromicina 1 µg/ml durante 3 semanas para la eliminación de las células no infectadas. De esta manera se obtuvieron las líneas celulares de WT y loxP/loxP. Por la técnica del western blot WB se comprobó la inmortalización frente anticuerpos AgT y p53.

4.8. Delección del receptor de la insulina IR in vitro por el sistema de Cre-recombinasa

4.8.1. Delección del IR por el sistema Cre-recombinasa

Puesto que todas las líneas celulares generadas e inmortalizadas a partir de animales IR lox/loxP, contenían estas secuencias flanqueando el exón 4 del IR, in vitro se procedió a suprimir la expresión del IR, mediante el sistema Cre-Lox, el cual permite escindir del genoma una región flanqueada por estas secuencias. En el caso del IR loxP, al escindir el exón 4, en el mensajero queda un codón de parada que detiene la traducción del IR, perdiendo completamente su función (Figura 4.7).

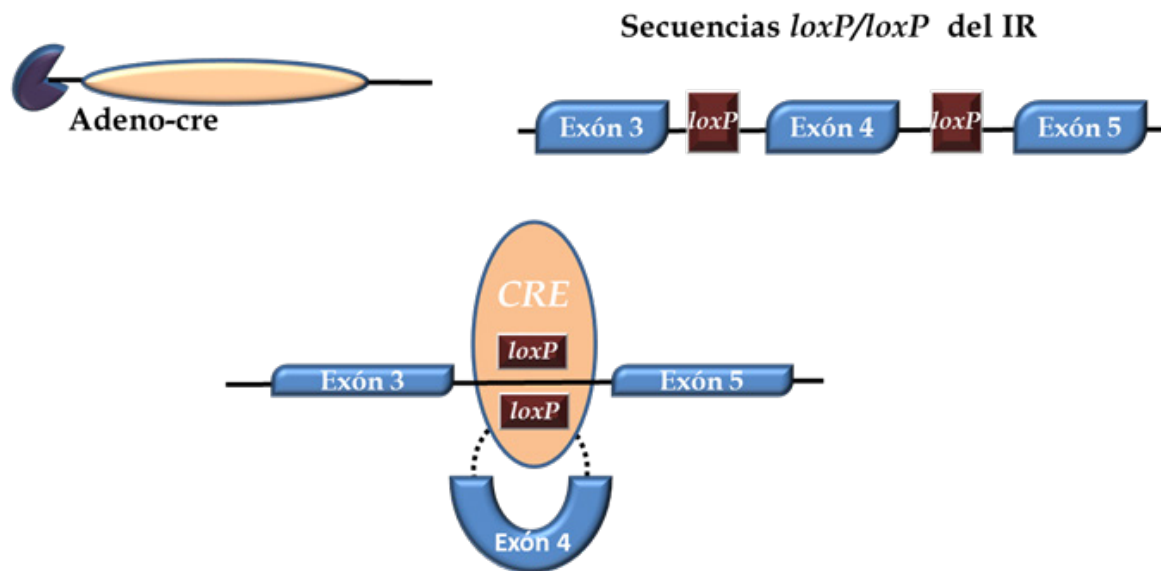


Figura 4.7. La secuencia loxP de 34 pb existe naturalmente en el genoma del bacteriófago P1. Consiste en una secuencia asimétrica de 8 pb entre dos secuencias palindrómicas de 13 pb. Esquema de la eliminación del exón 4 del IR por el sistema Cre-Lox.

Se sembraron 2×10^4 células por cada pocillo de multi-placas de 12. Las células IR loxP/loxP en subconfluencia se infectaron con adenovirus que codifican Cre recombinasa (Ad-CMV-Cre), para lo cual se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 500 (recomendado por la casa comercial). Las células fueron tratadas con una mezcla de DMEM sin suplementar (1 ml), polibreno (8 μ g/ml) y Ad-CMV-Cre (2 μ l), por cada pocillo, durante 6 horas. Tras este tiempo, el sobrenadante con adenovirus fue reemplazado por medio de cultivo, y se aislaron colonias individuales, comprobándose la recombinación por PCR. Las células fueron subclonadas dos veces y se volvieron a infectar con adenovirus para asegurarse de que la escisión fue completa. De esta manera quedó establecida la línea celular IR -/-.

El procedimiento antes descrita se realizó en las tres líneas celulares MAEC, CM y VSMC, encontrando que tanto las células CM como VSMC presentaban una buena sensibilidad a la infección con Ad-CMV-Cre, por lo que se pudo establecer las líneas IR-/- . En las células MAEC se

probaron distintos MOI desde 500 a 1000 (MOI máximo recomendado por la casa comercial) pero estas no fueron susceptibles a la infección con Ad-CMV-Cre por lo cual no se pudieron generar más líneas celulares a partir del IR loxP/loxP.

4.8.2. Generación de líneas celulares por sobreexpresión de RecA y RecB por infección retroviral

Resultaba de gran interés el conseguir establecer una línea celular IR -/- en las células cardiovasculares puesto que permitía la posibilidad de estudiar el papel diferencial del de las dos isoformas del receptor de la insulina (IRA e IRB) en el contexto cardiovascular.

Las células IR-/- permitieron reconstituir la expresión de una única isoforma en CM y VSMC. Estas fueron sembradas en placas de 60 mm en sus respectivos medios de crecimiento hasta que alcanzaron el 70-80% de confluencia. Se retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Las infecciones retrovirales se realizaron con aproximadamente 1 ml de sobrenadante viral (p-BABE-hygro -RecA o p-BABE-hygro Rec B), enriquecido con polibreno 8 µg/ml (Sigma-Aldrich) durante 1 hora. Después se añadieron 5 ml de medio completo sin antibióticos y se incubó a 37°C durante 72 h más. Tras los 3 días de infección, se procedió a la selección durante 3 semanas con higromicina (0.2 mg/ml) y posterior subclonaje, realizado por dilución límite.

Las líneas celulares IR-/- y las líneas reconstituidas con las isoformas A o B del IR, se caracterizaron mediante western blot frente a la subunidad β de ese mismo receptor para verificar que el AdenoCRE había funcionado. Las células IR-/- no mostraban la banda correspondiente al IR mientras que las líneas reconstituidas con Rec A o RecB, sí lo presentaron. Para comprobar que estas líneas IR RecA e IR RecB sólo expresaban una única isoforma, se caracterizaron mediante qRT-PCR semicuantitativa. Así se analizó la presencia o ausencia del exón 11 del IR, respectivamente.

Gen	Secuencia de los oligonucleótidos		Tm No. Ciclos
	Sentido (S)	antisentido (AS)	
<i>IR Exon 11 ratón</i>	S) 5' ATCAGAGTGAGTATGACGACTCGG 3'	(AS) 5'TCCTGACTTGTGGGCAATGGTA 3'	60° C 30 ciclos
<i>IR Exon 11 humano</i>	(S) 5' ACCAGAGTGAGTATGAGGATTTCGG 3'	(AS) 5'TCCGGACTCGTGGGCACGCTGGTC 3'	

Tabla 4.3. Secuencia de oligonucleótidos utilizado para la caracterización de las isoformas del IR. Se utilizaron oligonucleótidos de ratón y de humano. Las secuencias humanas fueron utilizadas para la caracterización de las isoformas del receptor de la insulina.

4.9. Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación

4.9.1. Condición de Mantenimiento

Las células fueron cultivadas en recipientes de poliestireno tratado para cultivo, en un incubador con atmósfera controlada, alta humedad y CO₂ al 5% a 37°C. Se realizaron subcultivos celulares dos veces a la semana, tras lavado con PBS e incubación con tripsina. Las células fueron crecidas en sus respectivos medios anteriormente descritos.

Se puede producir grandes cambios en los cultivos celulares, a nivel del fenotipo y funcionalidad celular, debido a la contaminación con micoplasmas. Esta tipo de contaminación muchas veces no es detectable a simple vista (Russell et al. 1975), por lo que se realizó de manera rutinaria 2 veces qRT-PCR para detectar la presencia o ausencia de micoplasma.

Las células también fueron congeladas en FBS suplementado con dimetilsulfóxido 10% (v/v), e introducidas en criotubos debidamente etiquetados. El proceso de congelación fue llevado a cabo a un ritmo de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, enfriando desde temperatura ambiente hasta -80°C . Para ello los criotubos se colocaron sobre un soporte de polietileno bañado por isopropanol (Frosty, Thermo Scientific) que fue introducido en un congelador a -80°C , temperatura a la cual las células pudieron mantenerse durante meses. Para periodos más largos de mantenimiento, los criotubos fueron llevados a un tanque de nitrógeno líquido (-196°C). La descongelación fue realizada de forma rápida, pasando los viales directamente de -80°C o nitrógeno líquido a un baño a 37°C , con agitación manual. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en placas de cultivo con medio completo.

4.9.2. Disolución de ácidos grasos

El protocolo para la preparación y disolución de los ácidos grasos utilizados durante este estudio, fue amablemente proporcionado por la coordinadora científica del Institute for Diabetes Research and Metabolic Diseases (IDM) of the Helmholtz Center Munich, Alemania, Anna-Maria Ordelheide.

Primero, se realizó una solución patrón de ácido palmítico (PA) 200mM (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol absoluto y una solución patrón de ácido Oleico (AO) 100mM (Sigma-Aldrich) disuelto en NaOH (0.1 M). Adicionalmente, se prepara un tampón 20% albúmina de suero bovino (BSA) / Krebs-Ringer-HEPES pH 7.4, con la cual se prepara la solución intermedia de los ácidos grasos al 5mM. Esta solución de ácidos grasos conjugados, se prepara unos minutos antes de la experimentación dejándose en agitación a 37°C hasta que se observa la disolución total de los ácidos grasos, para evitar la oxidación de estos. Finalmente, se adiciona la cantidad necesaria de este ácido conjugado (5mM)-20% BSA, al medio de conjugación de ácidos grasos el cual consiste en DMEM bajo en Glucosa, BSA (2.5%) y FBS (0.5%). Este protocolo permite guardar las proporciones 5:1 BSA-ácido graso que permite un adecuado transporte y biodisponibilidad del ácido graso a la célula (Krogmann et al. 2011).

4.9.3. Condiciones de experimentación

Las células fueron sembradas el día anterior a la experimentación, dejándose durante un tiempo mínimo de 20 horas, para su estabilización. Previo a la estimulación, cuando las células alcanzan una confluencia entre 70-80%, el medio de crecimiento fue cambiado por medio de experimentación (bajo en glucosa sin suero). Solo se necesitó una confluencia celular del 100% para los experimentos de migración. En los experimentos de señalización y proliferación el medio de experimentación se incubó durante 3-5 horas y entre 16-18 horas para los estudios de la expresión de RNAm y migración.

Pasado este tiempo, se cambió nuevamente el medio por medio de experimentación fresco y posteriormente fueron incubadas con los correspondientes estímulos. En el caso de los experimentos con ácidos grasos, el medio de crecimiento, fue cambiado por medio de experimentación durante tres horas, tiempo tras el cual fue cambiado por el medio conjugado BSA-Ácido graso ratio 5: 1 mencionado anteriormente, puesto que un aumento en la saturación mecánica del transportador (en este caso es BSA), facilita la entrada del ácido graso a la célula (Abumrad et al. 1981). En todos los casos los inhibidores fueron añadidos 30 min antes del estímulo.

4.10. Ensayos de muerte celular, supervivencia, proliferación y migración

4.10.1. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Después de tratar a las células con el estímulo deseado en cultivo, se recogieron células del sobrenadante y las pegadas a los platos se levantaron con tripsina. Las células se centrifugaron las células (5 min, $110 \times g$, $4^{\circ}C$) y lavaron con PBS dos veces. El precipitado que contenía las células se resuspendió en 300 μl de PBS frío, y se añadieron 700 μl de etanol absoluto a $-20^{\circ}C$, para su fijación durante un minuto en frío. A continuación, las células fueron lavadas 2 veces más con PBS frío. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 30 min a $37^{\circ}C$ en 500 μl de PBS atemperado con RNAasa. La RNAasa A de origen pancreático (Roche) fue preparada a una concentración de 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 15 mM, calentada a $100^{\circ}C$ durante 15 min (con el fin de inactivar cualquier ADNasa contaminante), enfriada lentamente a temperatura ambiente, se realizaron alícuotas y conservó a $-20^{\circ}C$. Por último, se añadieron 25 μl de yoduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich) 0.1% (p/v) en PBS. Se valoró el contenido celular de ADN por incorporación de PI, (emisión fluorescente entre 562-588 nm), pudiendo diferenciarse células apoptóticas ($<2n$), células en fase G0/G1, y células en proliferación (fase S/G2-M, $>2n$). Para ello se utilizó un citómetro FACScalibur y el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson) (Figura 4.8.).

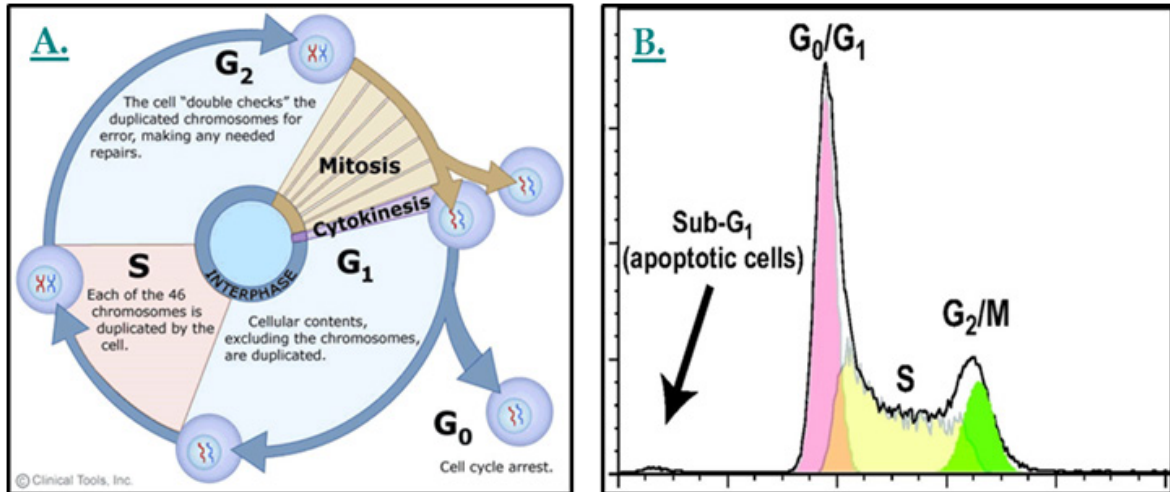


Figura 4.8. Representación esquemática del ciclo celular. **A.** Etapas del ciclo celular (Fase M: división celular; Fase G₁: crecimiento, diferenciación y especialización, las células se preparan para la replicación; Fase S: Replicación y síntesis de ADN; Fase G₂: las células se prepara para la división celular; Fase G₀: especialización celular y salida del ciclo por pérdida de la capacidad para dividirse). **B.** Típicos histogramas de ADN obtenido usando citometría de flujo para detectar las diferentes fases del ciclo celular.

4.10.2. Cristal violeta

La técnica de tinción con cristal violeta, es uno de los métodos colorimétricos más utilizados para evaluar la viabilidad y proliferación celular usado por muchos autores (Vega-Avila & Pugsley 2011). Esta técnica se basa en la incapacidad de la tinción de células muertas en contraste con la capacidad de tinción de células viables adherentes (Flick & Gifford 1984).

Para la realización de este ensayo se sembraron 6×10^4 células por pocillo de placas multi-pocillo de 12. Después de la estimulación, las células fueron lavadas con PBS y teñidas con cristal violeta 0,2% (p/v) en 2% etanol (v/v) durante 10 min. Seguidamente las placas fueron lavadas varias veces con H₂O y se dejaron secar. Para cuantificar la cantidad de colorante fijado se añadió 1 ml de SDS 1% (p/v) por pocillo. La absorbancia de cada punto se midió a 560 nm en un lector de placas FluoStar Omega (Bmg Labtech, Ortenberg, Alemania).

4.10.3. Proliferación por recuento de celular e incorporación de BrdU

La tasa de proliferación celular se evaluó utilizando el kit de ELISA proliferación por incorporación bromodesoxiuridina (BrdU) (Roche) y por recuento de células en contador celular (CASY). Se utilizó la medida de incorporación de BrdU, durante la síntesis de ADN en células proliferantes, para evaluar la proliferación. BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina es un nucleótido sintético análogo a la timidina que sirve para determinar el número de células de una muestra que se hallan en la fase de síntesis de la mitosis. Esta técnica colorimétrica se basa en la detección de las moléculas de bromodesoxiuridina que se incorporan al ADN durante el proceso de replicación.

Para evaluar el papel del receptor de la insulina IR y del IGF-1R en la proliferación fueron sembradas 1×10^4 VSMC (Gómez-Hernández, A. et al. 2013) en medio de crecimiento, por cada pocillo de una placa de 96 pocillos sin recubrimiento, en tanto que solo fueron sembradas 5×10^3 VSMC para observar el efecto de los ácidos grasos. Al día siguiente, las células fueron incubadas durante 3-5 horas con el medio de experimentación. Tiempo tras el cual las células estimuladas con los diferentes estímulos: insulina (10-100nmol/L), TNF- α (10ng/ml), IGF-1 o IGF-2 (10-25nM) durante 24 horas. También, se evaluó el efecto del pre-tratamiento con inhibidores de ERK-MAPK (U0126), inhibidor PI3K (LY294002) e inhibidor p38-MAPK (SB20358).

La tecnología del contador CASY se utilizó para confirmar los datos obtenidos por la técnica de BrdU. La tecnología del CASY utiliza canales múltiples de recuento celular en un campo eléctrico, fue creada en 1987 por Schärfe System GmbH. Esta tecnología se puede aplicar para el recuento celular, cultivo celular de manera eficiente y precisa. Esta técnica también fue utilizada con los ácidos; se pre-trataron las células con AO (0.8 mM) durante dos horas y posteriormente se co-incubaron con PA (0.4mM), ANG II (10-6M y TNF- α (10ng/ml) durante 18 horas más.

La viabilidad celular se puede evaluar sobre la base de la integridad de la membrana plasmática: las células vivas - tienen membranas plasmáticas intactas mientras que las membranas de las células muertas se descomponen. Cuando una célula se expone a un campo de baja tensión, la corriente eléctrica no puede ir a través de la membrana intacta (si es viable). De lo contrario, ya que la membrana celular se rompe, campo eléctrico puede ir a través de la célula en apoptosis, ya que hay poros en su membrana.

Se sembraron 6×10^4 células por pocillo de placa multi-pocillo 24 en medio de crecimiento, al siguiente día se cambió el medio por el medio de experimentación y fueron estimuladas como se describió anteriormente en este apartado. Posteriormente el medio fue retardado de las células, se lavó con PBS para eliminar todas las células muertas y se levantaron las células con tripsina. Se pudo analizar la viabilidad celular dependiente de estímulo, al diferenciar mediante tecnología CASY de contaje, las células vivas de las que ya estaban en proceso de muerte celular programada, y la proliferación al observar el incremento de células viables con respecto a las células viables del control.

In vivo e in vitro

4.11. Análisis de la expresión genética

4.11.1. Aislamiento de RNA

4.11.1.1. La obtención de RNA

Para la extracción del RNA, Se siguió el método de Chomczynski y Sacchi el cual consiste en la extracción de RNA con una mezcla de tiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo (Chomczynski & Sacchi 1987). Después de la experimentación, se lavaron los platos con PBS,

se añadió 1ml de Trizol (Life technology), se homogenizó bien y se recogió cada muestra en un eppendorf. Manteniendo una temperatura constante de 4°C para el manejo de las muestras. Posteriormente se añadió 200 µL de Cloroformo. Las muestras se homogenizaron con ayuda de un agitador manual por 15 segundos y se dejó reposar de 10-15 minutos a 4°C. Se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12000 rpm a 4° C, obteniéndose finalmente 3 fases: el precipitado rosa, la fase intermedia blanquecina y el sobrenadante incoloro. Se recoge el sobrenadante y se agrega al eppendorf debidamente marcado que contiene 700 µL el isopropanol. Estos se dejaron reposar durante mínimo una hora a -20° C o durante toda la noche, para favorecer la precipitación del RNA. Después, se realizó una nueva centrifugación de 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descarta con mucho cuidado y se procede a realizar dos lavados con etanol al 80% frío, para quitar cualquier resto de DNA genómico. Finalmente, se deja secar, y el precipitado se re-suspender en 10 µL H₂O ultrapura estéril.

4.11.1.2. Determinación de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos aislados

El contenido de ácidos nucleicos se valora por una lectura espectrofotométrica doble a 260 y 280 nm en cubeta de cuarzo. La lectura de la absorbancia a 260nm permite calcular la concentración del ácido nucleico de la muestra mientras que la medida de absorbancia a 280 nm corresponde con el máximo de absorbancia de las proteínas que viene dado por los aminoácidos aromáticos. Por lo tanto la relación A₂₆₀/A₂₈₀ da una idea del grado de contaminación de las muestras. Se consideró un buen grado de pureza un ratio entre 1.8 - 2.0. En caso de contaminación con proteínas o fenol la D.O A₂₆₀/A₂₈₀ disminuye significativamente y hace imposible una cuantificación precisa de los ácidos nucleicos. La lectura a 310 nm se corresponde a la absorbancia debida a otras impurezas.

La valoración cuantitativa de los ácido nucleicos aislados se realizó teniendo en cuenta que una unidad de D.O a 260 se corresponde con 50µg/ml de ADN de doble cadena y con 40µg/ml de RNA y ADN de cadena sencilla (Sambrook & Gething 1989).

4.11.2. Síntesis de ADNc por transcripción inversa qRT-PCR

Con el fin de eliminar posibles contaminaciones con DNA en la preparación de RNA, que posteriormente pudiera interferir en la reacción de cadena de la polimerasa, se realizó un tratamiento con enzima ADNasa I (Roche). Se utilizó 10 U de ADNasa I por cada 5 µg de RNA de cada muestra) en un tampón de incubación (Tris-HCl 40 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.9) y 20 U de inhibidor de RNAasas, RNasin (Promega), Las muestras se incubaron 30 min a 37°C, y posteriormente la ADNasa se inactivó por 5 min a 95°C.

Para la síntesis del ADNc, la solución resultante de la reacción anterior fue sometida a transcripción inversa con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), utilizando primers aleatorios y retrotranscriptasa (RT) según las instrucciones del fabricante, para obtener una concentración de 20 µg/µl de cDNA. La mezcla RNA-RT fue llevada a máquina de PCR para realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una la amplificación de ADN, que consistieron en una primera fase a 25°C 10 minutos, posteriormente 37°C a 120 minutos y finalmente a 4°C hasta su utilización.

4.11.3. Reacción en cadena de la polimerasa PCR y electroforesis en gel de agarosa

La PCR fue realizada a partir del ADN extraído de cola de ratón o bien de ADNc. Se usaron reactivos de Biotools, salvo excepciones indicadas. Para la reacción se utilizó un 1 μ l de ADN en un volumen final de 25 μ l compuesto de tampón de reacción [Tris-HCl 75 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, pH 9.0], primers 0.2 μ M (cada uno), dNTPs 0.2 mM (cada uno) y 1 U de ADN polimerasa. Para la PCR se usó una máquina de PCR Veriti 96-well (Life Technologies) y las siguientes condiciones. Para el paso de hibridación se usó la T_m (temperatura de melting) teórica de los primers 5°C (ajustada por la concentración de sales, usando Primer-BLAST).

Mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5-3% (p/v) en TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0), se resolvió el producto de la PCR obtenido anteriormente. Se utilizó un tampón de carga con una concentración final de Tris-HCl 1.7 mM, azul de bromofenol 0.005% (p/v), xileno cianol 0.005% (p/v), glicerol 10% (v/v), y EDTA 10 mM, pH 7.6. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE. Como marcadores para electroforesis de ADN se utilizaron los siguientes: para PCR, Phi-X174/HaeIII (Promega) o el PCR low ladder set (Sigma-Aldrich); para plásmidos o fragmentos grandes, Lambda/HindIII (Promega) o 1 Kb Plus Ladder (Life Technologies). El resultado fue visualizado mediante un transiluminador UV, para lo cual el gel fue suplementado con GelRed (Biotium, Hayward, EE.UU.) Las imágenes captadas con una cámara CCD (charged coupled device), ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).

4.11.4. qRT-PCR

Se realizó la cuantificación de la expresión de los genes de interés por reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR). El contenido de ADNc obtenido a partir del RNA de tejidos o cultivos celulares se evaluó en un ABI Prism 7900 (Life Technologies), para lo cual se utilizaron 20ng de ADNc en una mezcla de maxter mix (polimerasa) y la sondas taqman (Life Technologies) correspondiente al gen de interés. (Ver sección anexos la tabla de sondas taqman (Anexos). Mediante esta técnica se obtuvo el valor Ct, que corresponden a los datos de luminiscencia de cada una de las muestras para cada gen. A partir estos Ct se pudo llegar al valor RQ para cada muestra, el cual se calculó como ayuda visual para entender el resultado, pero no constituye una escala lineal.

En nuestro caso, cada muestra se estudió por duplicado, por lo que se hizo una media aritmética de los Ct. A continuación se calculó el incremento de cada muestra, llamado Δ Ct, que viene dado por la diferencia del Ct del gen de interés y el Ct del gen endógeno normalizador [Δ Ct=Ct (gen1) – Ct (GAPDH)], corrigiéndose así cualquier error en la preparación de las muestras. El $\Delta\Delta$ Ct corresponde al Δ Ct de cada muestra menos el Δ Ct de la muestra control de la experimentación y finalmente, se obtuvo el valor RQ, que es potencia negativa de base 2 $\Delta\Delta$ Ct de cada muestra ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Los resultados de la expresión génica se interpretaron en función de los valores RQ, donde un RQ inferior a 0,5 significa un descenso de expresión, existe menos del 50% de número de copias que en la muestra considerada control; un RQ mayor que 0,5 pero menor de 2, se consideró una expresión normal, ya que está comprendido en un intervalo de \pm 50% de lo considerado normal;

y RQ mayor que 2 corresponde a un aumento de expresión, ya que son niveles superiores al 50% de la expresión normal.

4.12. Análisis de la expresión proteica

4.12.1. Obtención de proteínas

4.12.1.1. Extracto de proteína total

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron a partir de células en cultivo o a partir de tejidos. Las placas de células en cultivo fueron lavadas dos veces con PBS frío y posteriormente se procedió a la disrupción mecánica de la muestra con 100- 500 μ l de tampón de lisis a 4°C dependiendo de la densidad del tejido o de las células. El tampón de lisis utilizado contenía: Tris-HCl pH 7.4 (50 mM), Cloruro de sodio (NaCl) (150 mM), Tritón X-100 (1%v/v), Pirofosfato sódico (Na₄P₂O₇) (30 mM), Fluoruro sódico (NaF) (50mM) pH 7.5, Ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) (1mM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (5mM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1mM), aprotinina (1 mM) y leupeptina (1 mM). Tras depositar el lisado celular en tubos tipo eppendorfs 1.5 ml, se dejaron las muestras durante 5-10 minutos sobre el hielo, antes de ser centrifugados los lisados (15 min, 12500 rpm, 4°C). Se recogió el sobrenadante con el lisado proteico, y se descartaron los restos celulares del pellet. Finalmente el producto de lisado se guarda entre -20 y -80°C.

4.12.1.2. Fraccionamiento celular

La técnica de extracción de proteínas por fraccionamiento celular permite la extracción de proteínas de diferentes compartimientos celulares y su estudio de forma individual. Esta técnica se basa en la disgregación o rotura (homogeneización) de las células y liberación de los orgánulos, seguido de una macro filtración y finalmente la purificación de componentes celulares, aplicándose técnicas de centrifugación diferencial.

Para el fraccionamiento celular se utilizó un tampón de homogenización compuesto de Tris-HCl (20 mM) pH. 7.4, EGTA (2 mM), EDTA (2 mM), PMSF (1 mM), β -Mercaptoetanol (10 mM), Aprotinina (10 μ g/ml), Leupeptina (10 μ g/ml) disuelto en agua ultrapura estéril (concentraciones finales indicadas). Tras la estimulación las células se levantaron de forma mecánica con 500 μ l de PBS y se realizó una centrifugación 2114 r.p.m durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspende entre 200 μ l - 500 μ l de tampón de homogenizado y a continuación las muestras son pasadas 30 veces por un “Douncer glass homogenizer” para obtener el extracto de proteínas totales. Después, el homogenizado se centrifugó 1300 r.p.m durante 5-10 minutos a 4°C, con lo cual se obtuvo la fracción nuclear en el precipitado. El sobrenadante se centrifugo a velocidad máxima (14.00 r.p.m) durante 1 hora a 4°C, tras lo cual se obtuvo la fracción citosólica comprendida en el sobrenadante. Para obtener la fracción de la membrana el precipitado se lavó tres veces con 100 μ l del tampón de homogenización más triton X-100 (1% v/v) y se centrifugó velocidad máxima 14.00 r.p.m durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante es el componente soluble en tritón (constituye la fracción de membrana) es separado del material insoluble en tritón (fracción del citoesqueleto).

4.12.1.3. Cuantificación de la proteína

La cuantificación de las proteínas obtenidas, se realizó mediante el ensayo descrito por Bradford (Bradford 1976). Para ello se usó el agente Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) y albúmina de suero bovino Bio-Rad protein Assay standard H (Bio-Rad) para preparar una curva patrón de concentraciones crecientes. La cuantificación se realizó mediante la adición de 1ml de dilución de reactivo de Bradford (en una proporción 1:4) a 1-2 μ l de muestra. La lectura espectrofotométrica de la reacción se realizó a una longitud de onda de 595 nm.

4.12.2. Western –blot y Electroforesis

4.12.2.1. Preparación de la muestra para electroforesis

Las muestras fueron preparadas para que tuvieran una concentración igual en μ g/ μ l de proteína, preparando en un volumen determinado y diluyendo con tampón de lisis, además se completan con tampón de Laemmli concentrado (Laemmli, 1970). El tampón de Laemmli o de carga contenía Tris-HCl (100 mM), glicerol (5% v/v), SDS (2% p/v), 2-mercaptoetanol (1%v/v), azul de bromofenol (0,004 % p/v) a pH 6.8, concentraciones finales indicadas. Las muestras son desnaturadas (5 min, 95°C) y cargados 25-35 μ g por muestra en geles de SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Junto a las muestras, se usó un estándar de marcador del peso molecular Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad).

4.12.2.2. La electroforesis en SDS-PAGE

La separación del componente proteico en los extractos celulares, se realizó por electroforesis en geles discontinuos de SDS-PAGE, según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), empleando un equipo de electroforesis Miniprotean II o TetraSystem (Bio-Rad). Se prepararon geles con dos zonas de diferente concentración de poliacrilamida: 5% para el gel superior concentrante y 6-15% para el gel inferior separador, a partir de una solución al 30% que contiene acrilamida y bis-acrilamida en proporción 29:1 (Bio-Rad). El primero, que contiene los pocillos de depósito de muestras, sirve para concentrar y alinear las muestras; el segundo, para separar las proteínas según su peso molecular. La concentración de poliacrilamida final en el gel utilizada varió en función del peso molecular de las proteínas a analizar. Los geles contienen además de poliacrilamida, SDS que confiere a las proteínas una carga negativa uniforme, Tris-HCl pH 8.8 para el gel separador; pH 6.8 para el concentrante, persulfato amónico y TEMED que catalizan la polimerización del gel. Las proporciones de los diferentes componentes varían según el tipo de gel. Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó el siguiente tampón: Tris-base (25 mM), glicina (190 mM) y SDS (0.1% p/v) a pH 8.3, con una fuente Powerpac HC de Bio-Rad, a un voltaje constante de 100 v para el gel concentrante y de 110-130 v para el gel separador, durante el tiempo requerido para una buena separación de las proteínas.

4.12.2.3. Transferencia a membranas de PVDF

Una vez finalizada la separación de proteínas, estas fueron transferidas de los geles de SDS-PAGE a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) Immobilon-P 0.45 μ m (Merck Millipore, Billerica, EE.UU.), mediante el paso de corriente eléctrica, mediante el método de transferencia en húmedo. Previo a la transferencia, las membranas altamente hidrofóbicas de PVDF

fueron activadas mediante un breve paso por metanol, y se dejaron en tampón de transferencia el cual contenía Tris-HCl (5mM), glicina (38 mM) y metanol (20% v/v).

4.12.2.4. El bloqueo y la incubación con anticuerpos

Después de terminar la transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos a proteínas. Para ello, las membranas se incubaron con leche en polvo desnatada (5% p/v) o BSA (3% p/v) disuelta en TTBS, el cual es un tampón que contiene Tris-HCl (10 mM), NaCl (150 mM, pH 7.5) y Tween-20 (0,05%v/v), agitación suave, durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue bloqueada con leche o con BSA, dependió del anticuerpos de interés; generalmente cuando fueron usados anticuerpos fosfo-específicos, las membranas se bloquearon con BSA, ya que la leche en polvo contiene grandes cantidades de fosfo-proteínas como la caseína. Posteriormente se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario diluido en TTBS hasta el día siguiente, en una cámara fría a 4°C, con agitación suave. La lista con todos los anticuerpos utilizados y sus diluciones se encuentra en la tabla 4.4. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de entre 15-20 minutos con TTBS en agitación fuerte, tiempo tras el cual la membrana, se incubó con el anticuerpo secundario el cual también estaba disuelto en TTBS. La incubación con el anticuerpo secundario fue de una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Este anticuerpo secundario contiene a la fracción constante de la especie correspondiente en la que se hubiese generado el anticuerpo primario. Finalmente se volvió a lavar 3 veces más con TTBS, en agitación fuerte.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia
SV 40T Ag (H-1)	Santa Cruz	SC-25326
p53	Santa Cruz	SC-6243
Anti-Actin α -Smooth Muscle	Sigma	A2547
Anti- β Actin	Sigma	A5316
Insulin R β (C-19)	Santa Cruz	SC-711
Phospho-IRS1 Ser 307	Cell signaling	2381
Anti-IRS-1	Millipore	06-248
Anti-IRS-2	Millipore	
α -p85	Millipore	
Phospho- p70 S6 Kinase (Thr389)	Cell signaling	#9205
p70 S6 Kinase	Cell signaling	#9202
Phospho- p44/42 MAPK	Cell signaling	#9101
p44/42 MAPK	Cell signaling	#9102
p-AKT ser 473	Cell signaling	#9273
AKT	Cell signaling	#9272
NOS2	Santa Cruz	SC-651
p-NOS3 (ser1177)	Santa Cruz	SC-12972
NOS3 (c-20)	Santa Cruz	SC-654
Phospho-AMPK α (Thr172)	Cell signaling	2531
AMPK α	Cell signaling	2532
Phospho-Acetyl CoA Carboxylase (Ser79)	Cell signaling	3661
Acetyl CoA Carboxylase	Cell signaling	3662
phospho -GSK3 α β ser 21/9	Cell signaling	9331
GSK3 α β	Cell signaling	5676
Glut-4	Millipore	
Na ⁺ /K ⁺ ATPase α (H-300)	santa Cruz	SC-28800
Phospho-Try	Millipore	
IGF-1R (c-20)	Santa Cruz	
IGF-1R (c-20)	Santa Cruz	SC-713
IGF-2(N-20)	santa Cruz	SC-1415
Anti-Uncoupling Protein -2	Calbiochem	662047

Tabla 4.4. Tabla de los anticuerpos usados tanto *invivo* como *in vitro*.

4.12.2.5. La detección de anticuerpos por quimioluminiscencia

4.12.3. Inmunoprecipitación

La técnica de inmunoprecipitación es considerado el mejor ensayo para detectar las interacciones proteína-proteína, especialmente cuando se realiza con proteínas endógenas (ni sobreexpresadas ni marcadas). Las interacciones proteína-proteína se refiere a la asociación de proteínas y el estudio de esas asociaciones desde las perspectivas de la Bioquímica, transducción de señales y redes de interacción de proteínas (Phizicky & Fields 1995). La proteína de interés se aísla con un anticuerpo específico. Las moléculas que interactúan con la proteína se identifican posteriormente mediante un Western blot.

Se prepararon alícuotas de extractos de proteína total de (500-1000 µg), obtenidos y valorados según el método Bradford descrito anteriormente. A cada muestra se le añadió 1 µg del anticuerpo correspondiente y se incubaron en rotación a 4°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se adicionaron 20 µl de proteína A o proteína G agarosa (Roche), dependiendo si el anticuerpo primario usado era de ratón o de conejo. Se realizó una suspensión 50/50 en tampón de lisis, y se incubó bajo las mismas condiciones durante 2-4 horas para favorecer la interacción de los inmunocomplejos con las esferas y así permitir su separación de la fracción líquida. Por último, se procedió a su lavado con tampón de lisis. Los inmunoprecipitados se utilizaron para el análisis de la interacción con otras proteínas mediante Western blot. Se añadió el tampón de carga y se calentaron las muestras durante cinco minutos a 95°C para separar los complejos de la agarosa, quedando preparadas para ser analizadas en un gel de poliacrilamida (SDSPAGE).

4.13. Técnicas de imagen

4.13.1. Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas a baja densidad sobre cristales circulares de 1 cm de diámetro. Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y fijadas inmediatamente con una solución de paraformaldehído (4% p/v), durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con PBS, y se incubaron 5 min a temperatura ambiente con Triton X-100 (0.2% v/v) en PBS, con el fin de permeabilizar las células y permitir el marcaje de antígenos intracelulares. Para amortiguar la autofluorescencia celular, se lavaron las células y se incuban con una solución de NH₄Cl (50 mM), durante 15 min a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado, se bloquean los sitios de unión inespecíficos con una incubación en una solución de bloqueo de BSA (1%p/v), 0,2% Triton X-100 (v/v) en PBS suplementado con Tween-20 (0.05% p/v) (PBT) durante 45 min a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpos primarios, se realizó durante 1.5 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras lavado con PBT, se incubó con anticuerpo secundario 45 min. Tras un último lavado con PBT, las preparaciones se montaron sobre un portaobjetos con un líquido de montaje SlowFade Gold (Life Technologies) conteniendo DAPI para la visualización de núcleos. Las muestras fueron observadas generalmente al día siguiente para la estabilización del líquido de montaje, aunque las preparaciones son estables conservadas a 4° C en condiciones de oscuridad por unas semanas.

4.13.2. La inmunohistoquímica

Los tejidos como el arco aórtico, corazón y músculo esquelético se incluyeron en OCT. Se realizaron cortes de 7 μm de grosor, en un criostato a -20°C . Estos cortes se trataron con acetona durante 10 minutos, para su fijación. A continuación se realizó un tratamiento con metanol: H_2O_2 (3%) para inactivar la actividad peroxidasa endógena y después se realizaron lavados con PBS. Posteriormente se realizó un bloqueo con una solución de PBS con BSA (4%) y suero (6%) del huésped del anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente.

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

Las secciones se tiñeron con 3,3 L-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB, Dako Denmark) durante diez minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó una tinción de contraste con hematoxilina y se montaron con medio IBIDI. En cada experimento, se realizaron controles negativos sin el anticuerpo.

Antes de incluir los páncreas en parafina, estos se lavaron con PBS y conservados en una solución de Bouin que contenía, ácido picrico (1% p/v), formaldehído (10% v/v), ácido acético (5% v/v). Posterior a su inclusión, se realizaron cortes 5 μm de grosor a intervalos de 5 mm del tejido, con ayuda del micrótopo. Estos fueron depositados en la superficie de un baño de agua a 55°C para su extensión completa sobre portaobjetos. Para poder estudiar el tejido, los cortes fueron deshidratados, para eliminar la parafina. Se utilizó una batería de alcoholes en graduación decreciente. Se incubaron durante media hora con metanol: H_2O_2 (3%), se lavaron con PBS y se realizó un tratamiento con citrato durante 30 minutos. Los cortes fueron bloqueados, y posteriormente incubados a 4°C durante toda la noche, con el anticuerpo primario. A la mañana siguiente, se incubaron con un anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. La detección de las células β se realizó con tinción ABC peroxidasa, ya que el anticuerpo secundario estaba conjugado con biotina.

4.14. Otras técnicas

4.14.1. Marcaje de superficie celular por citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas y la presencia de biomarcadores. En los citómetros de flujo, las células en suspensión atraviesan un campo sobre el que incide un láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer relaciones en cuanto a tamaño y complejidad de las células.

Para la caracterización de las células endoteliales se utilizó en marcaje de superficie celular con anticuerpo para citometría de flujo. Las células fueron lavadas y tripsinizadas. Se realizaron lavados con PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , suplementado 2% FBS descomplementado, para detener la reacción enzimática. Posteriormente, 106 células endoteliales fueron marcadas con anticuerpo FITC anti-mouse CD31 de BioLegend en dilución 1:800. Se utilizó la misma dilución para el control de isotipo FITC Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl de BioLegend. Finalmente, se usó yoduro de propidio para descartar las células muertas, y fueron pasados por un citómetro BD FACSCalibur™. El fluorocromo ficoeritrina (PE) tiene un espectro de excitación 480 a 509 y de emisión a 578, por lo cual emite en verde FL1. CD31 normalmente se encuentra en las células endoteliales, plaquetas, macrófagos y células de Kupffer, granulocitos, células T/NK, linfocitos, megacariocitos, osteoclastos, neutrófilos. Lo cual lo convierte en un marcador diferencial de otros tipos celulares presentes en el vaso como son las células de músculo liso vascular y los fibroblastos.

4.14.2. La medición de la captación de glucosa en las CMLV

Las células fueron cultivadas a 80% de confluencia en 10% de suero fetal bovino DMEM y suero y glucosa privados durante 4 a 6 horas. A continuación, se añadió la insulina a los pocillos durante 30 minutos. La absorción de glucosa se midió mediante la incubación de las células con 2-desoxi-D-[1- ^3H] glucosa durante los últimos 10 minutos en las placas por triplicado de 6 experimentos independientes descritas como anteriormente (Escribano et al. 2007).

4.14.3. Estadística: GraphPad Prism

El análisis estadístico se realizó con el programa científico comercial GraphPad Prism 5, Software, Inc. Este software permitió realizar la comparación de los resultados mediante un análisis de la varianza o test ANOVA y por el test de comparación múltiple Bonferroni. Los resultados se expresan como media \pm SEM, el cual cuantifica la precisión con que sabe la verdadera media de la población, teniendo en cuenta tanto el valor de la SD y el tamaño de la muestra. Como valor de discriminación de diferencias estadísticamente significativas, se utiliza $p \leq 0.05$.

4.14.4. Cuantificación de blots: Image J

Los blots fueron cuantificados usando la herramienta “Analyze/Gels” de ImageJ. Fueron seleccionadas regiones rectangulares que incluyera todos los puntos del blot, se obtuvieron representaciones de la densidad de señal a lo largo de la región seleccionada por cada punto. Se dibujó una línea base y se obtuvo el área bajo la curva, indicativa de la señal relativa de cada punto. Los resultados fueron siempre normalizados con la señal del control β -actina, la cual es invariable.

5 RESULTADOS RESULTS

Parte I

Part I

5.1. Papel de las isoformas del IR y del receptor de IGF-1 (IGF-1R) en la proliferación de las células de músculo liso vascular y en la aorta de modelos experimentales murinos con alteraciones vasculares

5.1 The role of IR isoforms and insulin-like growth factor 1 (IGF-1R) in the proliferation of vascular smooth muscle cells and in aortas from murine models with vascular alterations.

5.1.1. Generación y caracterización de las líneas celulares

5.1.1 Cell lines generation and characterization

Para estudiar el papel de las isoformas del IR en la proliferación de las células de músculo liso vascular, se generaron líneas celulares a partir de las arterias aortas torácicas aisladas de ratones adultos de 8 semanas. Los ratones presentaban el exón 4 del receptor de la insulina flanqueado por secuencias loxP, y posteriormente se les realizó la delección *in vitro* del IR, obteniéndose células con y sin receptor de insulina (IRloxP+/+ VSMCs e IR-/- VSMCs, respectivamente). Además, a partir de la línea celular IR-/- VSMCs se reconstituyó las isoformas del IR de manera específica. Obtuvimos dos líneas celulares que expresasen sólo la isoforma A o B del IR (IRA e IRB VSMCs, respectivamente).

In order to study the role of IR isoforms in the proliferation of vascular smooth muscle cells, cell lines were generated from isolated thoracic aorta arteries from 8 week-old-adult mice. These mice had IR gene-targeting vector with loxP sites flanking exon-4, in order to be able to delete the IR *in vitro*. The purpose was to obtain cells either with or without IR receptors (IRloxP+/+ and IR-/- VSMCs, respectively). Furthermore, specifically IR isoform were reconstituted from IR-/- VSMCs line, getting in this way two cell line expressing only A or B isoform (IRA and IRB VSMCs, respectively).

En primer lugar, los cultivos primarios de células de músculo liso vascular (IRloxP+/+

First, WT and IRloxP primary cell cultures were immortalized by retroviral infection and selected with puromycin antibiotic. As a result of the immortalization, the cells express antigen-T of SV40. At the same time, antigen-T is able to kidnap p53 (keeping p53 in its active form). In order to check the cell immortalization, Western blots against antigen-T and

VSMCs y WT VSMCs) se sometieron a una infección retroviral seguida de una selección con el antibiótico puromicina durante tres semanas. Como consecuencia de la inmortalización, las células expresan el antígeno T de SV40. A su vez, el antígeno T secuestra p53 manteniéndola de forma activa. Para comprobar su inmortalización, se realizó un Western blot frente a los anticuerpos que reconocen el antígeno T y p53. Asimismo, se confirmó que tras la inmortalización, las células no perdieron la expresión de α -SMA, marcador específico de VSMCs (Figura 5.1).

p53 antibodies were performed. Also, it was confirmed that after the immortalization, cells maintain α -SMA expression, which is a VSMCs specific marker (Figure 5.1).

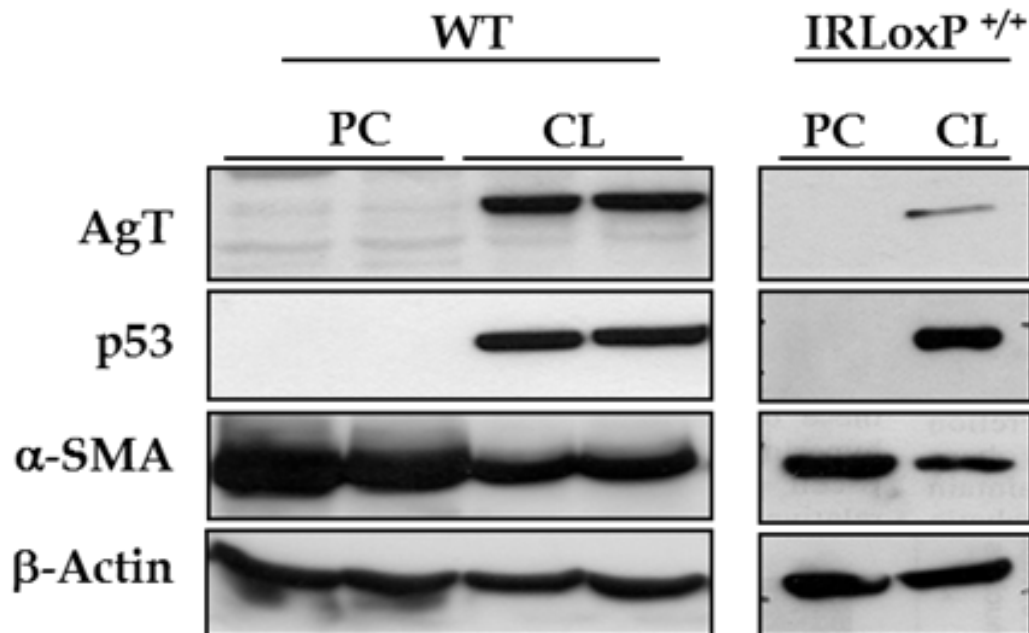


Figura 5.1. Generación y caracterización de las líneas celulares IR WT e IRloxP^{+/+} de músculo liso vascular. Confirmación de la inmortalización de las células mediante Western blot de las líneas celulares WT y IRloxP^{+/+} frente anticuerpos para AgT, p53, α -SMA. Se normalizó frente a la β -actina. Abreviaturas: PC, cultivo primario; CL, líneas celulares.

Figure 5.1. Generation and characterization of the IR WT and IRloxP^{+/+} vascular smooth muscle cell lines. Cells immortalizations were confirmed by Western blot analysis. There were detected by the presence of antigen-T, p53 and α -SMA. They were normalized against the endogenous level of β -actin. Abbreviations: PC, primary culture; CL, cell lines.

Las células carentes del IR fueron obtenidas a partir de la línea celular IR loxP^{+/+} VSMCs. La delección del IR se realizó mediante una infección con adenovirus Cre-recombinasa in vitro, quedando establecida la línea IR^{-/-} VSMCs. Posteriormente, en estas células carentes del IR fueron reconstituidas con la isoforma A o B del IR. De esta manera, quedaron estable-

IR lacking cells were obtained from IR loxP^{+/+} VSMCs line. The IR deletion was carried out by adenovirus Cre-recombinase infection in vitro, setting up the IR^{-/-} VSMC line. Subsequently, it was reconstituted insulin receptor A or B isoform expression in the IR lacking cell line. Thereby, four cells lines (IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA and IRB VSMCs) were

cidas las cuatro líneas celulares: IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA e IRB VSMCs.

Las isoformas del IR se diferencian únicamente por la expresión de un exón adicional en IRB (exón 11) (Seino & Bell 1989), siendo ambas isoformas reconocidas de manera similar por el anticuerpo IR β , que reconoce la cadena β del IR. Mediante Western blot, se comprobaron que los niveles de expresión del IR fueron muy similares en las líneas IRloxP^{+/+}, IRA e IRB VSMCs y se confirmó la falta de expresión del IR en IR^{-/-} VSMCs. También, se comprobó que en ninguna de las líneas celulares se afectó la expresión de α -SMC como marcador específico de este tipo celular (Figura 4.2.A).

La expresión diferencial de las dos isoformas del IR fue analizada en primer lugar por qRT-PCR. Se confirmó que tanto IRA e IRB VSMCs expresan específicamente sólo la isoforma A o B, respectivamente (Figura 5.2B).

established.

IR isoforms differ only in the additional expression of exon-11 in IRB (Seino & Bell 1989); both isoforms are recognized in a similar manner by IR β antibody that recognizes β -chain of the IR. By Western blot analysis were checked that the IR levels were very similar in IRloxP^{+/+}, IRA e IRB VSMCs. Also, Western blot analysis revealed the IR lacking expression in IR^{-/-} VSMCs. Besides, it was verified that α -SMC, as specific marker of this cell type, expression was not altered in any of the cells (Figure 5.2.A).

The differential expression of IR isoforms was tested by qRT-PCR. It was confirmed that IRA as IRB VSMCs only express specifically IRA or IRB isoform, respectively (Figure 5.2.B).

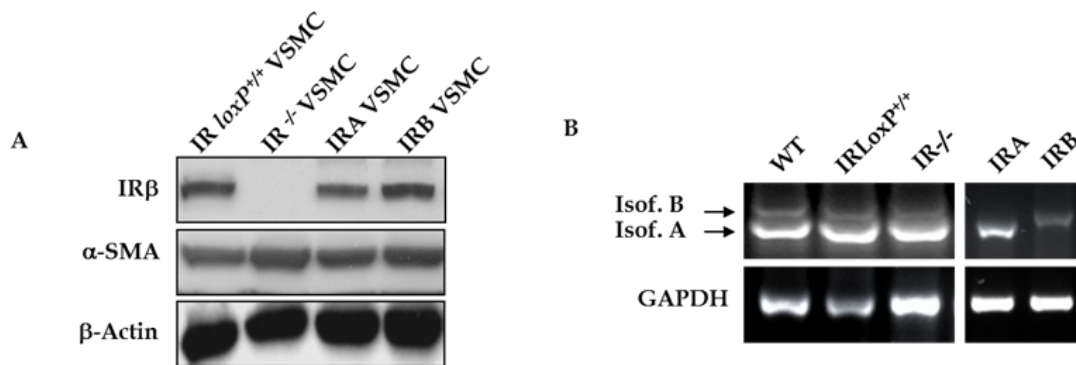


Figura 5.2. Expresión del receptor de insulina en las diferentes líneas celulares: IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA e IRB VSMCs. A. Western blot frente al anticuerpo IR β presente en todas las líneas celulares a excepción de IR^{-/-} VSMCs, para la confirmación de la delección del IR en esta línea y la presencia del IR en las otras tres líneas celulares. También se realizó la incubación con α -SMA para verificar que no hay pérdida de dicho marcador específico del tipo celular. Normalizado con el anticuerpo frente a la β -actina. B. Análisis por qRT-PCR de la expresión a nivel del mRNA del exón 11 del IR. La líneas IRloxP^{+/+} e IR^{-/-} VSMCs expresan el mRNA de las dos isoformas del IR (IRA, sin exón 11; IRB, con exón 11). Las líneas IRA e IRB VSMCs sólo expresan selectivamente una de las isoformas.

Figure 5.2. Insulin receptor expression in different cell lines: IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA and IRB VSMCs. A. Western blot against IR β antibody present in all cell lines with exception of IR^{-/-} VSMCs, for confirmation of the deletion of IR in this line, and against α -SMA to verify that there is no loss of cell type specific marker. It was normalized with antibody against β -actin. B. qRT-PCR analysis of mRNA expression level of the exon 11 of the IR. The lines IRloxP^{+/+} and IR^{-/-} VSMC express the mRNA of the two isoforms of the IR (IRA without exon 11; IRB with exon 11). The IRA and IRB lines selectively express only one of the isoforms.

El anticuerpo anti-IR β (Ab-4) reconoce tanto la isoforma IRA como IRB. Comercialmente no existe un anticuerpo que reconozca específicamente y de forma diferencial una de las isoformas del IR por Western blot. Sin embargo, el doctor Giorgio Sesti describió la generación de un anticuerpo policlonal que reconoce el exón 11 del receptor de la insulina (a IRB). Este anticuerpo puede ser utilizado para la detección específica de la isoforma B del receptor IR por un Western blot directo o mediante sucesivas inmunoprecipitaciones podríamos también detectar también a la IRA (Sesti et al. 1994). El anticuerpo anti-IRB utilizado para la caracterización de las líneas IRA e IRB VSMCs fue proporcionado amablemente por Dr. Sesti y el Dr. Hribal de la Universidad Magna Grecia de Catanzaro, Italia (Figura 5.3).

En primer lugar, se inmunoprecipitaron 150 mg de los extractos de proteínas totales de ambas líneas celulares (IRA e IRB VSMCs) contra el anticuerpo IRB y se realizó el Western blot frente a IRB (Figura 5.3.A). A continuación, con el sobrenadante de la primera inmunoprecipitación de cada línea de VSMCs se realizó una segunda inmunoprecipitación contra el anticuerpo IRB (Figura 5.3.B). Y prácticamente, no se detectaron bandas en ningunas de las dos líneas celulares. Por último, se realizó la tercera inmunoprecipitación frente a anti-IR β (Ab-4), con el sobrenadante de la segunda inmunoprecipitación por cada línea VSMCs. Se realizó un Western blot contra IR β (Figura 5.3.C). Para entender los resultados de esta tercera inmunoprecipitación, tenemos en cuenta dos cuestiones. En primer lugar, el anticuerpo IR β reconoce ambas isoformas del IR. En segundo lugar, con la tercera inmunoprecipitación con IR β (o incluso con la segunda inmunoprecipitación contra IRB) en el sobrenadante sólo permanecerían complejos IRA. Finalmente, se comprobó que en la tercera inmunoprecipitación contra IR β , sólo hay complejos con IRA, puesto que sólo se presentó banda correspondiente al IR en células IRA VSMCs.

The anti-IR β (Ab-4) antibody recognizes the IRA isoform as well as the IRB isoform. Commercially, there is not an antibody that recognizes only one of the isoforms by Western blot. However, Dr. Giorgio Sesti described the generation of a polyclonal antibody, which contains the insulin receptor exón 11, making it a specific antibody for IRB. This antibody could be use for IRB specific detection, by a simple Western blot, or IRA detection by serial immunoprecipitations (Sesti et al. 1994). The anti-IRB antibody (presence of exón 11) could be used for IRA and IRB VSMCs lines characterization was kindly provided by Dr. Sesti y el Dr. Hribal from the University Magna Grecia de Catanzaro, Italia (Figure 5.3).

First of all, 150 mg were immunoprecipitated of total protein extraction from both cells lines (IRA e IRB VSMCs) with IRB antibody. Western blot was run against IRB (Figure 5.3.A). A second immunoprecipitation was done with the IRB antibody, in the supernatants of the first immunoprecipitation of each VSMCs line (Figure 5.3.B). Last, a third immunoprecipitation was performed with anti-IR β (Ab-4), in second immunoprecipitation's supernatants, for each VSMCs line. This time, a Western blot was run against IRB, again (Figure 5.3.C). In order to understand the results of this third immunoprecipitation, we might to keep two questions in mind; first, the IR β antibody recognises both IR isoforms. And the second point, in the third immunoprecipitation against IRB (or even with the second immunoprecipitation against IRB), the supernatant only contain IRA complex. So, we checked IRA complexes presences in the third immunoprecipitation against IR β . The showing band corresponds to IR in IRA VSMCs.

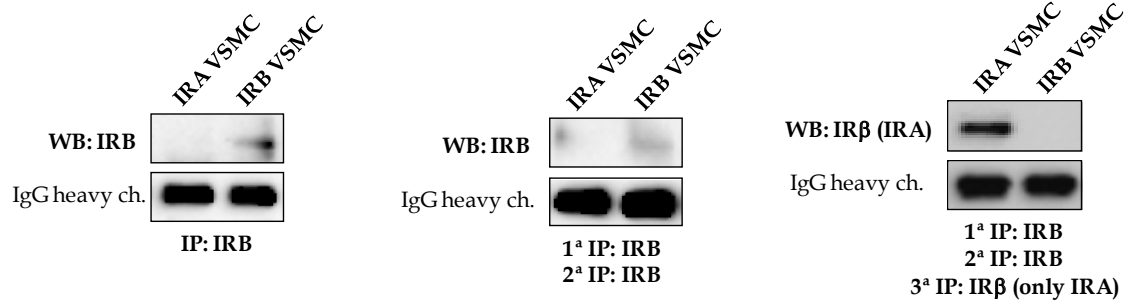


Figura 5.3. Caracterización de las líneas IRA e IRB VSMCs. Validación del anticuerpo específico que reconoce la isoforma IRB, proporcionado por Dr. Sesti y el Dr. Hribal, para ser utilizado en las líneas celulares IRA e IRB VSMCs, mediante la formación de inmunocomplejos seriados. IP: inmunoprecipitación; WB: Western blot; IRB (isoforma B del receptor de insulina); IRA (isoforma A del receptor de insulina); IRβ (reconoce tanto la IRA como IRB). A. Primera IP: IRB; WB: IRB. B. Segunda IP: IRB; WB: IRB. C. Tercera IP: IRβ; WB: IRB. Sólo queda la fracción que no precipita Anti-IRB, que corresponde a los complejos con la isoforma IRA. Sólo da positivo en las IRA VSMCs.

Figure 5.3. Characterization of IRA and IRB VSMCs lines. Validation specific antibody recognizing the IRB isoform, provided by Dr. Sesti and, for use in the IRA and IRB VSMCs by serial immunocomplex formation. IP: immunoprecipitation; WB: Western blot; IRB (insulin receptor B isoform); IRA (insulin receptor A isoform); IRβ (recognizes both the IRA and IRB). A. First IP: IRB; WB: IRB. B. Second IP: IRB; WB: IRB. C. Third IP: IRβ; WB: IRB. Only the fraction not precipitated with Anti-IRB, which corresponds to the fraction of IRA isoform. It was only positive in the IRA VSMCs.

En estas líneas celulares generadas también se estudiaron los niveles de proteínas involucradas en la señalización de la insulina por Western blot. Los niveles proteicos de expresión fueron muy similares en las distintas proteínas estudiadas, como: IRS-1, IRS-2, α -p85, AKT, p70 y ERK (Figura 5.4).

Also, in cell lines generated were studied proteins involved in insulin signalling pathway by Western blot analysis. Similar protein levels were very similar in the different proteins studied, such as: IRS-1, IRS-2, α -p85, AKT, p70, and ERK (Figure 5.4).

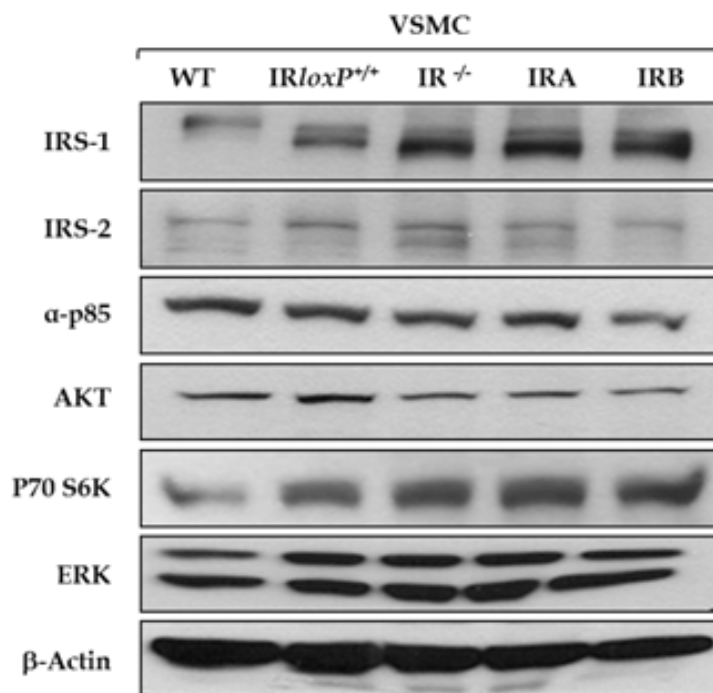


Figura 5.4. Análisis por Western blot de la ruta de la señalización de insulina en las cinco líneas celulares obtenidas. Se analizó la expresión proteica de IRS-1, IRS-2, p85α, AKT, p70S6K y ERK. Normalización frente a su β-actina. No se encontraron diferencias entre la expresión de las distintas proteínas en las distintas líneas celulares.

Figure 5.4. Insulin signalling pathway in the five VSMCs lines obtained. Protein levels expression of IRS-1, IRS-2, α-P85, AKT, p70S6K and ERK were analyzed. It was normalized against the endogenous level of β-actin. There was not found differences between of the protein levels in the different cell lines.

5.1.2. Señalización de la insulina y captación de glucosa en las células de músculo liso vascular

Se evaluó la funcionalidad del IR en las líneas celulares reconstituidas con las isoformas A o B del IR (IRA e IRB VSMCs). Las células fueron estimuladas con insulina (10nM) durante 5 minutos y se inmunoprecipitaron frente a los anticuerpos anti-IRβ o anti-IRS-1. Finalmente, se analizó la fosforilación en tirosina (Tyr) por Western blot tanto del receptor de la insulina como de su sustrato 1 (Figura 5.5).

Se encontró que ambas líneas celulares, IRA e IRB VSMCs, presentan el receptor de la insulina funcional debido a que la insulina indujo un aumento en la fosforilación en tirosina del

5.1.2. Insulin signalling and glucose uptake in the vascular smooth muscle cells

The IR functionality was evaluated in IRA or IRB isoform reconstituted VSMCs lines. Cells were stimulated with insulin (10nM) for 5 minutes, each line being compared with its corresponding control. Immunoprecipitations against anti-IRβ or anti-IRS-1 were done. Finally, the phosphorylation in tyrosine (Tyr) was also analysed by Western blot (Figure 5.5).

It was found that both IRA e IRB VSMCs lines were functional and working properly. Insulin stimulation induced a Tyr phosphorylation increase in IR at short time period (5 minutes). It was observed an increase of 60% and 30% of the phosphorylation in Tyr of IR in IRA

IR. Se observó un aumento del 60% y 30% con respecto al control en IRA e IRB VSMCs, respectivamente. Después, se analizó la fosforilación en tirosina de IRS-1, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con el IR. Así, la insulina indujo un aumento de la fosforilación de IRS-1 del 100% y del 50% frente al control en IRA y en IRB VSMCs, respectivamente (Figura 5.5).

e IRB VSMCs respectively compared to the controls. Subsequently, the phosphorylation in Tyr of IRS-1 was analysed and similar results were observed as the data obtained with IR. There was a significant increase of the phosphorylation in Tyr of IRS-1 in both cells lines, showing an increase of 100% and 50% compared to their controls in IRA e IRB VSMCs, respectively (Figure 5.5).

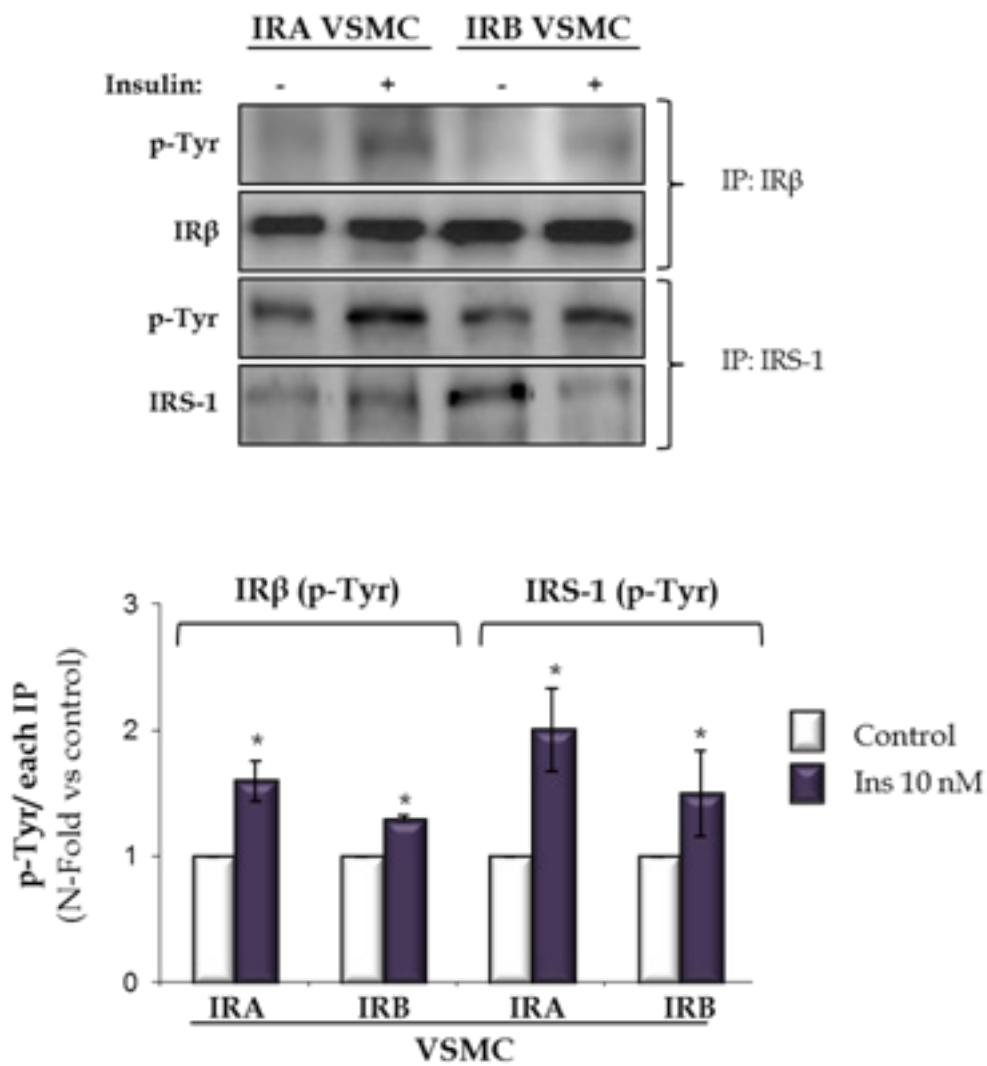


Figura 5.5. Análisis por Western blot de la fosforilación en tirosina (Tyr) del IRβ e IRS-1 inducida por la insulina. Las líneas celulares IRA e IRB VSMCs fueron estimuladas con 10nM de insulina durante 5 minutos. La fosforilación del residuo de tirosina tanto del IRβ como del IRS-1 fue demostrada por inmunoprecipitación seguido de Western blot frente a Tyr. Abreviaturas: IP, inmunoprecipitación; WB, Western blot.

Figure 5.5. Western blot analysis of insulin induced phosphorylation of tyrosine (Tyr) in IRβ and IRS-1. IRA and IRB VSMCs were stimulated with 10 nM insulin for 5 minutes. The phosphorylation of the tyrosine residue in IRβ as IRS-1 was demonstrated by immunoprecipitation and Western blot. Abbreviations: IP, immunoprecipitation; WB: Western blot.

Posteriormente, se realizaron estudios de respuesta a diferentes dosis de insulina que permitieran conocer la menor concentración de insulina a la cual la ruta de señalización es estimulada en las cuatro líneas celulares (IRloxP+/+, IR-/-, IRA e IRB VSMCs) (Figura 5.6.A y 5.6.B). Cada línea celular fue estimulada con 10nM, 100nM, y 1000nM de insulina durante 10 minutos. Se analizó la fosforilación en AKT (S473), ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y p70S6K (Thr389), y sus respectivas proteínas totales.

Las células IRloxP+/+ VSMCs presentaron fosforilación de AKT y p70S6K a partir de la dosis de insulina de 100 nM. Sin embargo, ERK tiene una respuesta más moderada, aunque hay que tener en cuenta que la expresión basal de la proteína es más alta. Por otro lado, las células IR-/- VSMCs no presentaban respuesta a concentraciones fisiológicas de insulina, como era de esperar. Sin embargo, se observó la fosforilación tanto en AKT como en p70S6K en las IR-/-VSMCs, a concentraciones suprafisiológicas de insulina (1000nM), probablemente vía IGF-1R. Aún más importante, se encontró que la máxima fosforilación tanto de AKT, p70S6K como de ERK en respuesta a la insulina era en las IRA VSMCs (Figura 5.6.B).

Subsequently, different insulin dose response studies were performed; it allowed to know the lowest insulin concentration which stimulated the signalling pathway in the four cell lines (IRloxP+/+, IR-/-, IRA and IRB VSMCs) (Figure 5.6.Ay 5.6.B). Each cell line was stimulated with 10 nM-1 μ M insulin, for 10 minutes. AKT (S473), ERK1/2 (Thr202/Tyr204) and p70S6K (Thr389) phosphorylation and their total protein was analysed by Western blot.

The IRloxP+/+ VSMCs cells showed phosphorylation of AKT and p70S6K from 100 nM of insulin. However, ERK has a lower response. In contrast, at physiological concentrations of insulin, IR-/- VSMCs showed no response as expected. In contrast, AKT and p70S6K phosphorylation was observed in IR-/-VSMCs, with insulin supraphysiological concentration (1 μ M). More importantly, it was found that the maximum response to insulin in AKT, p70S6K and ERK phosphorylation was presented at the IRA VSMCs compared with other cell lines (Figure 5.6.B).

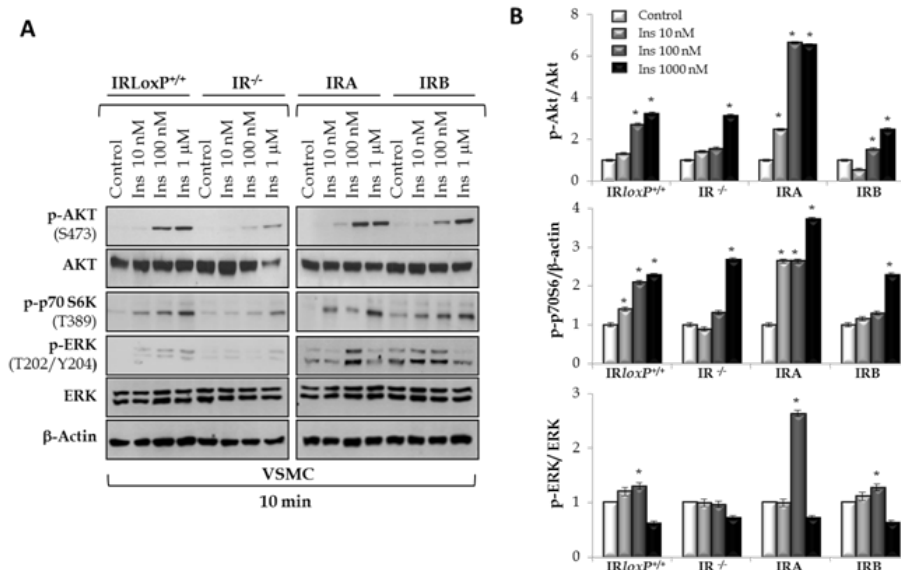


Figura 5.6. Análisis por Western blot de experimentos de respuesta a diferentes dosis de insulina. Se analizó la fosforilación de AKT (T308), ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y p70S6K (Thr389) en las líneas de VSMCs con el receptor de insulina (IRLoxP+/+), sin el IR (IR-/-), o que expresen específicamente las isoformas del IR (IRA e IRB) en respuesta a diferentes dosis de insulina (10 nM, 100nM y 1000nM) durante 10 minutos. Los experimentos se realizaron al menos cinco veces. β -actina se utilizó como control de carga. * $p < 0.05$ vs. control.

Figure 5.6. Western blot Analysis of dose-response experiments insulin dependent at 10 minutes. AKT, p70S6K and ERK phosphorylation were analyzed in VSMCs with IR receptors (IRLoxP+/+); VSMCs lacking IR (IR-/-); VSMCs bearing IRA isoform (IRA); VSMCs bearing IRB isoform (IRB) in response to different doses of insulin (10 nM, 100nM and 1000nM) for 10 minutes. Experiments were performed at least 5-fold. β -actin was used as loading control. * $p < 0.05$ vs. control.

A continuación, se valoraron la fosforilación de diferentes proteínas implicadas en la vía de señalización de la insulina a diferentes tiempos de estimulación con insulina. Para ello, las células IRLoxP+/+, IR-/-, IRA e IRB VSMCs fueron estimuladas con insulina a 10 o 100 nM a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30 minutos) (Figuras 5.7 y 5.8, respectivamente). Se observó un aumento significativo en la fosforilación de AKT y p70S6K a los 10-20 minutos de estimulación con 10nM de insulina en IRLoxP+/+ e IRA VSMCs. Siendo el incremento de la fosforilación en las células IRB VSMC más modesto comparado con las IRA VSMCs. Sin embargo, se encontró que a 10nM de insulina, la fosforilación de ERK1/2 aumenta significativamente en las células IRLoxP+/+ (a todos los tiempos) y un ligero aumento en las IRA VSMCs. Mientras que la fosforilación de ERK1/2 en las IRB parece ser menor incluso que en las IR-/- VSMCs (Figura 5.7).

The following experiments were performed to study insulin signalling and regarded different proteins implicated in it at several times after insulin stimuli. The Cells, IRLoxP+/+, IR-/-, IRA and IRB VSMCs, were stimulated with 10 or 100 nM insulin for different times (0, 10, 20, 30 minutes) (see in Figure 5.7 and 5.8, respectively). First, it was used insulin 10nM to study signalling. A significant increase of AKT and p70S6K phosphorylation in IRLoxP+/+ and IRA VSMCs was observed at 10 and 20 minutes after insulin stimulation; this phosphorylation's increase being less important in IRB VSMCs compared to the one observed in IRA VSMCs. However, it was found, with 10nM insulin stimuli, a significantly increase in the phosphorylation of ERK1/2, in the IRLoxP+/+ cells (at all times) and a slight increase in the IRA VSMCs. Meanwhile, ERK1/2 phosphorylation in IRB VSMCs was less important and decreased with the time (Figure 5.7).

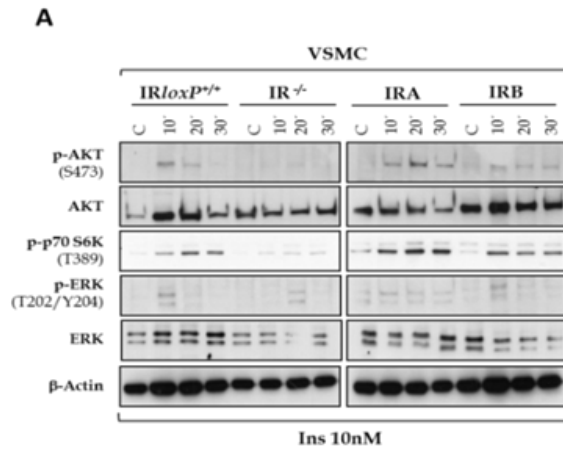


Figura 5.7. Curva de tiempo en respuesta a insulina (10 nM) de la fosforilación de AKT, p70S6K y ERK en VSMCs. Las células IRloxP +/+, IR-/-, IRA e IRB VSMCs fueron estimuladas con 10 nM de insulina a diferentes tiempos 0, 10, 20 y 30 minutos. Los experimentos se realizaron al menos cinco veces. β -actina se utilizó como control de carga. * $p < 0.05$ vs. control.

Adicionalmente, en las líneas celulares IRloxP+/+, IR-/-, IRA e IRB VSMCs, se realizaron curvas de tiempo (10, 20 y 30 minutos) en respuesta a 100nM de insulina. Se analizó la fosforilación de AKT (S473), ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y p70S6K (Thr389). La máxima respuesta inducida por la insulina se presentó en IRA VSMCs, en comparación con las otras líneas celulares. El mayor incremento en la fosforilación de AKT, p70S6K y ERK1/2 en IRA VSMCs, se observó a 10 minutos y en las IRloxP +/+ e IRB VSMCs a los 20 minutos (Figura 5.8).

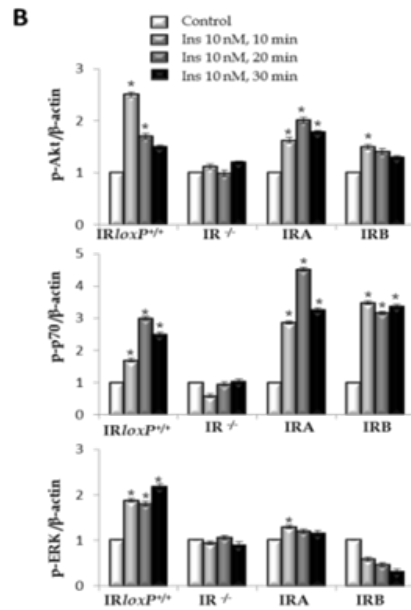


Figure 5.7. Time-course in response to insulin (10nM) in AKT, p70S6K y ERK phosphorylation in VSMCs. IRloxP +/+, IR-/-, IRA and IRB VSMCs were stimulated with 10 nM insulin at different times 0, 10, 20 and 30 minutes. Experiments were performed at least five times. It was normalized against the endogenous level of β -actin. * $p < 0.05$ vs. control.

In addition, time course with 100nM insulin were performed in IRloxP+/+, IR-/-, IRA, and IRB VSMCs lines at different times (10, 20 y 30 minutes). AKT (S473), ERK1/2 (Thr202/Tyr204) and p70S6K (Thr389) phosphorylation was analysed. The maximum response to insulin was observed in IRA VSMCs versus the other cell lines. The largest increase of AKT, p70S6K y ERK1/2 phosphorylation was noticed in IRA VSMCs at 10 minutes and in IRloxP+/+ VSMCs at 20 minutes (Figure 5.8).

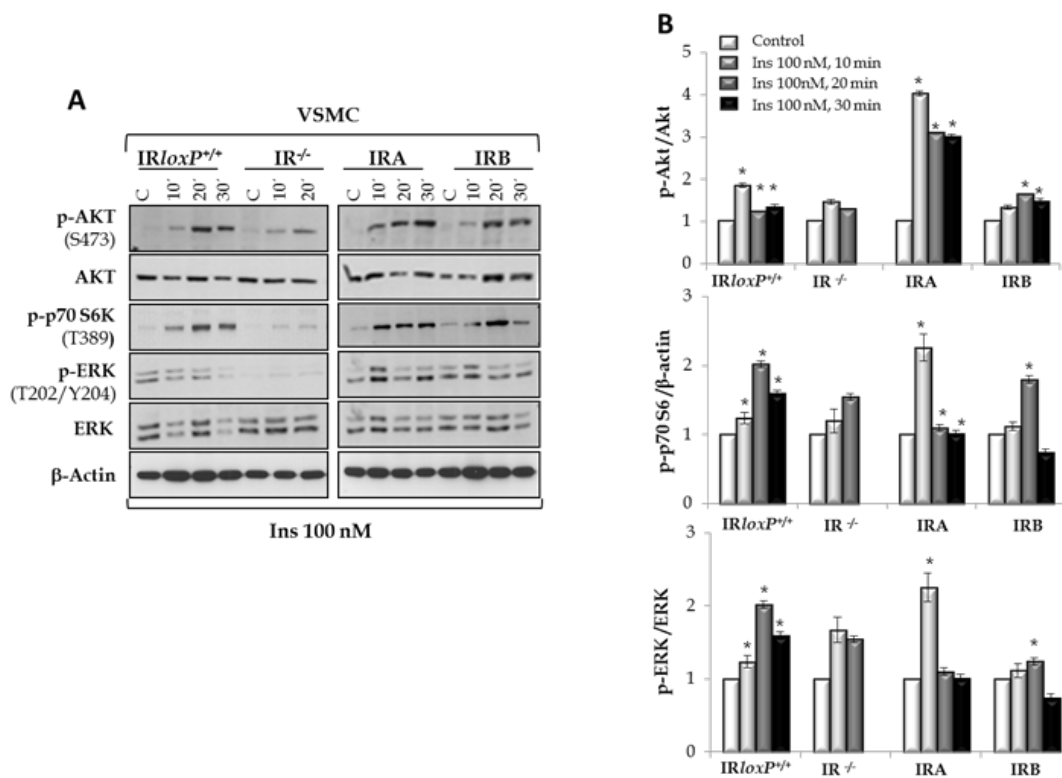


Figura 5.8. Curva de tiempo en respuesta a 100 nM de insulina de la fosforilación de AKT, p70S6K y ERK en VSMCs. Las células IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA e IRB VSMCs fueron estimuladas con 100 nM de insulina a diferentes tiempos 10, 20 y 30 minutos. Los experimentos se realizaron al menos cinco veces. β -actina se utilizó como control de carga. * $p < 0.05$ vs. control.

Figure 5.8. Time-course in response to insulin 100nM of AKT, p70S6K y ERK phosphorylation in VSMCs. IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA and IRB VSMCs were stimulated with 100 nM insulin at different times 0, 10, 20 and 30 minutes. Experiments were performed at least five times. It was normalized against the endogenous level of β -actin. * $p < 0.05$ vs. control.

Por otro lado, se realizaron estudios de captación de glucosa marcada radiactivamente con tritio en las células IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA e IRB VSMCs. Los experimentos fueron realizados de manera dosis dependiente de insulina (a 10nM y 100nM) (Figura 5.9.A). Se observó que tanto las células IRloxP^{+/+} como IRA VSMCs presentaron la mayor captación de glucosa a la dosis máxima de insulina (100nM). En contraste, la insulina no es capaz de inducir la captación de glucosa ni a la dosis máxima en las células IRB VSMCs. Esto también sucede en las células carentes del receptor de insulina (IR^{-/-} VSMCs) como era de esperar. Sin embargo, los niveles de expresión de la proteína GLUT-4 fueron similares en todas las líneas celulares estudiadas (Figura 5.9.B).

Furthermore, studies regarding the uptake of radioactively tritium-marked glucose were realised in IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA and IRB VSMCs. These experiments were carried out with different insulin doses (10nM y 100nM) (Figure 5.9.A). It was observed that the highest glucose uptake for the maximum insulin dose (100nM) took place in IRloxP^{+/+} cells as well as in IRA VSMCs. In contrast, insulin is not able to induce glucose uptake neither in the maximum dose in IRB VSMCs. As expected, the same occurs in cells lacking insulin receptor, i.e. IR^{-/-} VSMCs. However, GLUT-4 protein expression levels were similar in all the studied cells lines (Figure 5.9.B).

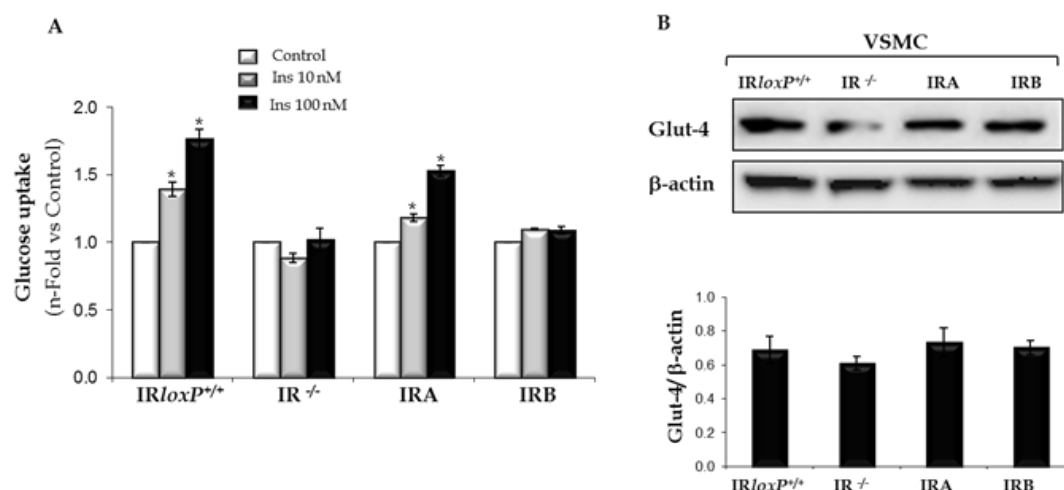


Figura 5.9. Estudio de la captación de glucosa en células de músculo liso vascular. A. Captación de glucosa marcada radiactivamente con tritio en las distintas líneas de VSMCs obtenidas. Ins: insulina. * $p < 0.05$ vs. control. B. Análisis por Western blot de los niveles de GLUT-4 en las líneas celulares de VSMCs. β -actina se utilizó como control de carga. Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces.

Figure 5.9. Glucose uptake study in vascular smooth muscle cells. A. Uptake of radioactively labeled glucose with tritium in the different lines of VSMCs obtained. Ins: insulin. * $p < 0.05$ vs. control. B. Western blot analysis of levels of GLUT-4 cell lines in VSMCs. It was normalized against the endogenous level of β -actin. All experiments were performed at least 3 times.

Para seguir analizando porque se producía la captación de glucosa de forma diferencial en IRA e IRB VSMC, se realizaron experimentos para observar la translocación del GLUT-4. En situaciones basales, el 90-95% de GLUT-4 se encuentra en el citoplasma compactado en pequeñas vesículas. Tras el estímulo con insulina, GLUT-4 se transloca a la membrana plasmática favoreciendo el movimiento de glucosa desde la sangre al interior de los tejidos (Muretta et al. 2007).

In order to, analyse the differential Glucose uptake in IRA and IRB VSMCs werer performed GLUT-4 translocation experiments. It has been described that under basal conditions, 90 to 95% of GLUT-4 is stored in small cytoplasmic vesicles. Following insulin stimulation, GLUT-4 translocates to the plasma membrane, stimulating glucose to move from the blood plasma into the tissues (Muretta et al. 2007).

Se estimularon las células IRA e IRB VSMCs con insulina 100nM durante 30 minutos. Posteriormente se obtuvieron las fracciones correspondientes a la membrana plasmática y al citosol, para estudiar la localización de GLUT-4. Se observó que la insulina a 100nM producía la translocación del GLUT-4 desde el citosol a la membrana plasmática en IRA VSMCs, pero no en IRB VSMCs. Como control de carga se utilizaron Anti-Na⁺/K⁺ ATPasa y anti-glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β) para la fracción de la membrana plasmática y la fracción citosólica, respectivamente (Figura 5.10).

IRA and IRB VSMCs were stimulated with 100 nM of insulin for 30 minutes. Thereafter, we obtained plasmatic membrane and cytosol fractions, in order to study GLUT-4 translocation. It was observed that 100nM insulin induced GLUT-4 translocation from cytosol to the plasma membrane in IRA VSMCs but not in IRB VSMCs. As a load control, Anti-Na⁺/K⁺ ATPase and anti-glycogen synthesis kinase 3 beta (GSK3 β) were respectively used for plasma membrane and cytosol fractions (Figure 5.10).

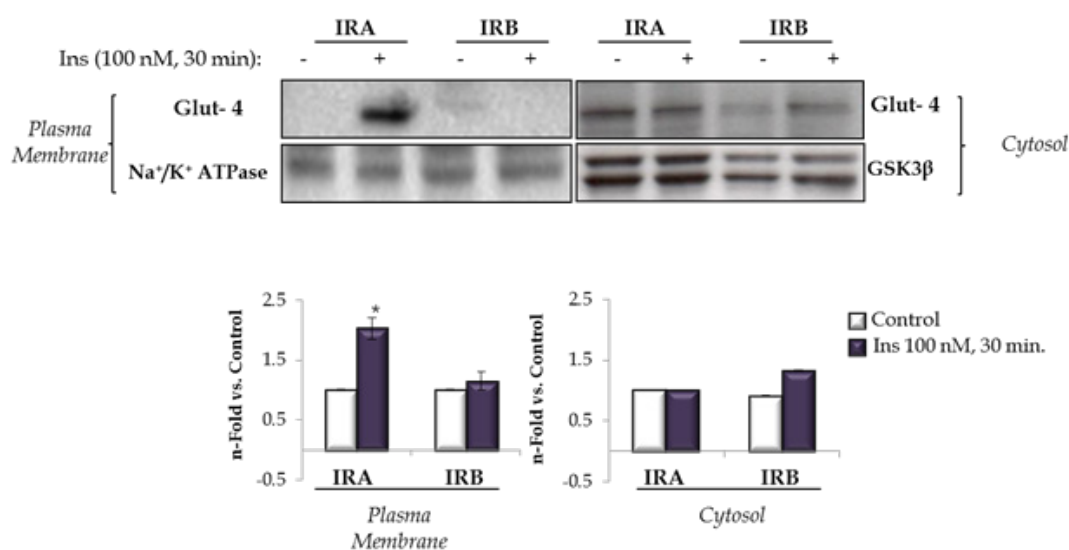


Figura 5.10. Análisis por Western blot de la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática en IRA e IRB VSMCs. Las células fueron estimuladas con 100nM de insulina durante 30 minutos. Se realizó fraccionamiento celular para analizar de forma individual la fracción citosólica, en donde en situaciones basales se encuentra el GLUT-4, y la fracción de la membrana plasmática, donde se encuentra GLUT-4 cuando se ha translocado por estimulación con insulina. Anti-Na⁺/K⁺ ATPasa y anti-glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3β) fueron utilizados como control de carga de la membrana plasmática y de la fracción citosólica, respectivamente. Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces. * $p < 0.05$ vs. control.

Figure 5.10. GLUT-4 translocation to the plasma membrane in IRA and IRB VSMCs. Cells were stimulated with 100nM insulin for 30 minutes. Cell fractionation was performed to analyze individually the cytosolic fraction in basal situations where appears GLUT-4, and the fraction of the plasma membrane, where it is GLUT-4 when it is translocated by insulin stimulation. Anti-Na⁺/K⁺ ATPase and anti-glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3β) were used as loading control of the plasma membrane and the cytosol fraction, respectively. All experiments were performed at least 3 times. * $p < 0.05$ vs. control.

5.1.3. Papel de las isoformas del IR en la proliferación de las células de músculo liso vascular inducido por estímulo proaterogénicos.

La proliferación y la migración de las células de músculo liso vascular de la aorta contribuyen al desarrollo del proceso aterosclerótico. Por ello, nos centramos en estudiar la proliferación de las VSMCs de manera diferencial entre las isoformas del IR frente a diferentes estímulos proaterogénicos.

5.1.3 The role of insulin receptor isoforms in the vascular smooth muscle cells proliferation by atherogenic stimuli.

Proliferation and migration of aortic vascular smooth muscle cells contributes to the developmental process of atherosclerosis. Therefore, it was important to study the proliferation of VSMCs in a differential manner between IR isoforms under different proatherogenic stimuli.

In pathological situations, like cancer or pancreatic hyperplasia as compensatory mechanisms against insulin resistance, it has been observed a change in the IR isoforms expression

Además en otras situaciones patológicas, como en cáncer o en la hiperplasia pancreática como mecanismo compensatorio frente a la resistencia a la insulina, se ha visto que puede producirse un cambio en el perfil de expresión de las isoformas del IR, aumentando la expresión de la IRA y desempeñando un papel relevante en la proliferación. Por ello, queríamos comprobar si tanto la insulina como algunos estímulos proaterogénicos presentes en el desarrollo de la placa de ateroma podrían modificar el perfil de expresión de las isoformas del IR en las VSMCs.

Las células IRloxP+/+ VSMCs fueron estimulados con insulina (10 nM o 100nM), TNF- α (10ng/ml), Ang II (10-6 M), ET-1 (10-8M), y U46619 (10-4M) durante 24 horas. Después, la expresión del mRNA para IRA o IRB fue analizada por qRT-PCR. Se observó que la insulina y los estímulos proaterogénicos indujeron un cambio en el ratio IRA/IRB, incrementando los niveles de mRNA de la isoforma A del IR (Figura 5.11).

La cantidad del gen diana (IRA o IRB) fue normalizado frente a su gen endógeno (Gapdh) y relativizado al control, donde $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta Ct = Ct$ (gen diana) - Ct (gen endogeno)]; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (para cualquier muestra) - ΔCt (del control)]. Donde Ct es el ciclo umbral. Los cálculos se explican con más detalle en el apartado de materiales y métodos (Sección 5.10.4).

profiles. In these pathologies, are being observed an increase of IRA expression, which plays a relevant role in the proliferation. It was set out that insulin like other proatherogenic stimuli presents in atheroma plaque development could modify IR isoforms expression profiles in VSMCs.

IRloxP+/+ VSMCs were stimulated with insulin (10 nM or 100 nM), TNF- α (10ng/ml), Ang II (10-6 M), ET-1 (10-8M), and U46619 (10-4M) for 24 hours. Subsequently, IRA or IRB mRNA expression was analysed by qRT-PCR. It was been observed that insulin and proatherogenic stimuli induced a change in the IRA/IRB ratio, increasing of IRA isoform mRNA levels.

The quantity of target gene (IRA or IRB) was normalised against its endogenous gene (Gapdh) and relativated to a control where $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta Ct = Ct$ (target gene) - Ct (endogenic gene)]; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (for whatever muestra) - ΔCt (the control). Ct is the threshold cycle. The calculations are detailed in the “materials and methods” (Part section 3.10.4).

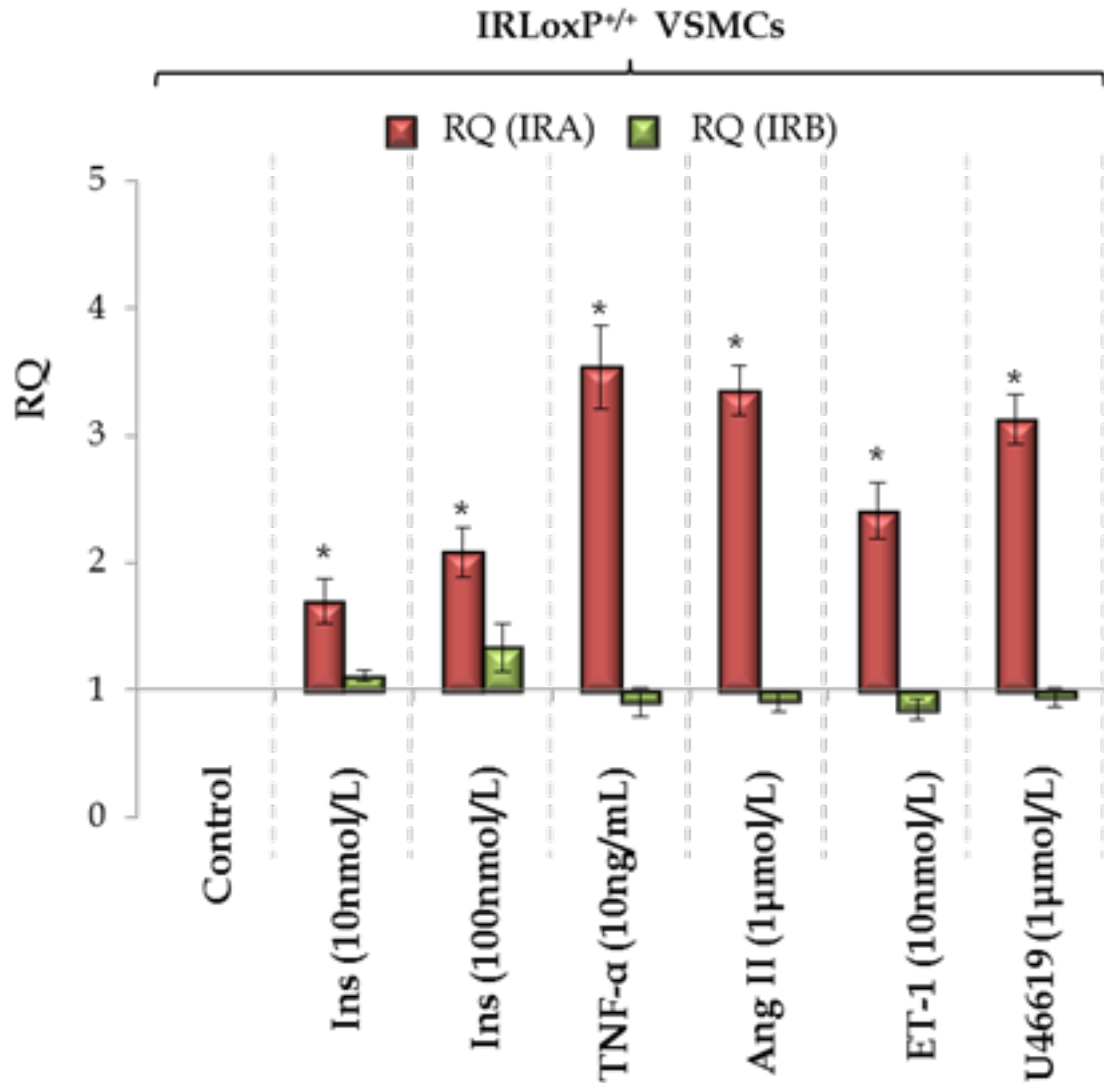


Figura 5.11. Perfil de expresión de las isoformas del receptor de insulina en *IRLoxP^{+/+}* VSMCs tratadas con insulina o estímulos proaterogénicos. Análisis del mRNA por qRT-PCR de la expresión de las isoformas IRA e IRB por la insulina, TNF- α , Ang II, ET-1, y U46619 durante 24 horas en *IRLoxP^{+/+}* VSMCs. Ct, ciclo umbral; RQ, la cuantificación relativa.

Para estudiar la proliferación inducida por insulina y otros estímulos proaterogénicos en las células de músculo liso vascular, en primer lugar, se analizó la tasa de proliferación por incorporación de BrdU. En segundo lugar, los hallazgos por incorporación de BrdU, se confirmaron por conteo celular en un equipo CASY (Figura 5.12).

Figure 5.11. IR isoform expression profile in *IRLoxP^{+/+}* VSMCs stimulated with insulin or proatherogenic stimulus. mRNA analysis by qRT-PCR of the expression of the IRA and IRB isoforms by insulin, TNF- α , Ang II, ET-1, and U46619 for 24 hours in *IRLoxP^{+/+}* VSMCs. Ct: threshold cycle; RQ: relative quantification.

In order to study the proliferation induced by insulin and other proatherogenic stimuli in vascular smooth muscle cells, BrdU incorporation rate was analysed at first. Secondly, the results observed with BrdU incorporation were confirmed by cell counting using a CASY cell counter (Figure 5.12).

IRWT, *IRLoxP^{+/+}*, *IR^{-/-}* cells, IRA and IRB

Las células IRWT, IRloxP+/+, IR-/-, IRA e IRB VSMCs fueron estimuladas con insulina 10nM, 100nM y 1000nM durante 24 horas. Se observó un discreto aumento en la proliferación de las líneas IRWT e IRB a 100nM de insulina. Sin embargo, no se observó ningún efecto de la insulina sobre la proliferación en las IR-/- VSMCs (Figura 5.12.A). En contraste, la insulina indujo un aumento significativo de la proliferación en las IRA VSMCs en forma dependiente de la dosis, que se ve también reflejada en la viabilidad celular medida por conteo celular a las 42 h. mediante el contador celular CASY (Figura 5.12.A y C).

Por otra parte, las células fueron pretratadas durante 1h con inhibidores tanto de la vía ERK-MAPK como de la vía PI3K antes de ser estimuladas con 10nM de insulina durante 24 horas (Figura 5.12.B). Se observó que el inhibidor U0126, que es un inhibidor altamente selectivo de MEK1/2 de la vía ERK-MAPK quinasas (Fukazawa et al. 2002), disminuyó significativamente la proliferación celular de IRA VSMCs. No obstante, el tratamiento previo con un inhibidor de PI3K, LY294002, no tuvo ningún efecto. Estos resultados sugieren que el aumento de la proliferación inducida por insulina en las VSMCs, está principalmente mediada por la isoforma IRA, a través de la vía de señalización MAPK (Figura 5.12.B).

VSMCs were stimulated with 10nM, 100nM and 1000nM insulin for 24 hours. At 100nM insulin, a modest increase of proliferation was observed in IRWT and IRB lines whereas no insulin effect was observed in IR-/- VSMCs proliferation. In contrast, insulin induced a significant and dose-related increase in IRA VSMCs (Figure 5.12.A). This result was confirmed by 100nM insulin stimulation during 42 hours by cell counting using a CASY cell counter (Figure 5.12.A y C).

On the other hand, the cells were pre-treated with MAPK/ERK and PI3K inhibitors for 1 hour previous to 10 nM insulin treatment for 24 hours (Figure 5.12.B). It was observed that U0126, a highly selective inhibitor of MEK1/2 (Fukazawa et al. 2002), significantly reduced IRA VSMCs proliferation. However, previous PI3K inhibition by LY294002 had no effect. These results suggest that insulin-induced proliferation in VSMCs and it is mainly mediated by isoform IRA through MAPK signalling pathway (Figura 5.12.B).

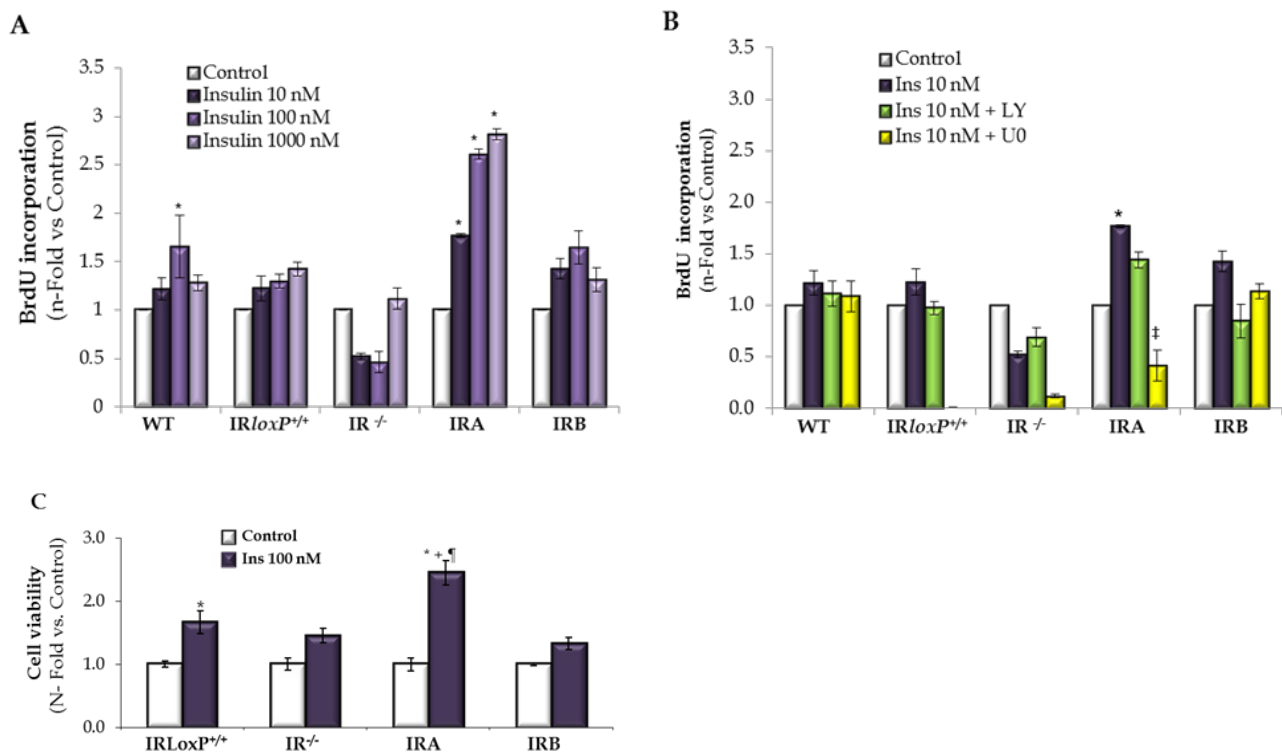


Figura 5.12. Estudio de la proliferación en respuesta a la insulina en las líneas celulares de músculo liso vascular. A. Tasas de proliferación en respuesta a diferentes dosis de insulina (10, 100, 1000 nM) en las líneas IRWT, IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA e IRB durante 24h. medida por la incorporación de BrdU. *p<0.05 vs. cada control. B. Efecto del pretratamiento con inhibidores de la vía ERK-MAPK (U0126) o inhibidor de la vía PI3K (LY294002) sobre las tasas de proliferación de las líneas de VSMCs inducida por la insulina 10nM. *p<0.05 vs. control; ‡p<0.05 vs. estímulos. C. Experimentos de viabilidad celular a dosis de insulina a 100nM realizados en contador celular CASY. *p<0.05 vs. cada control; +p<0.05 vs. IRloxP^{+/+}; ¶p<0.05 vs. IR^{-/-}. Todos los experimentos fueron realizados por los menos 4 veces.

A continuación, se estudió la proliferación inducida por estímulos proaterogénicos, como TNF- α (10ng/ml), Ang II (10-6 M), ET-1 (10-8M), y U46619 (10-4 M) en las distintas líneas de celulares VSMCs (Figura 5.13.A).

La citoquina proinflamatoria, TNF- α , indujo un ligero aumento de la proliferación en WT, IRloxP^{+/+} e IRB VSMCs. Además, Ang II y ET-1 indujeron un aumento de la proliferación en IRWT e IRloxP^{+/+}, pero no en las IRB VSMC. Por otro lado, el análogo del

Figure 5.12. Proliferation assay in response to insulin in VSMCs. A. proliferation rates in response to insulin dose dependent (10, 100, 1000 nM) in IRWT, IRloxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA and IRB for 24h by BrdU incorporation. *p<0.05 vs. each control. B. Effect of pretreatment with inhibitors of ERK-MAPK (U0126) or PI3K inhibitor (LY294002) pathway in the rate of VSMCs proliferation induced by 10nM insulin. *p < 0.05 vs. controls; ‡p < 0.05 vs stimuli. C. Cell viability assays to 100nM insulin in CASY cell counter. *p < 0.05 vs. each control; +p < 0.05 vs. IRloxP^{+/+}; ¶p < 0.05 vs. each IR^{-/-}. All experiments were performed at least 4 times.

Then, the proliferation induced by proatherogenic stimuli such as TNF- α (10ng/ml), Ang II (10-6 M), ET-1 (10-8M), and U46619 (10-4 M) was studied in all VSMCs lines (Figure 5.13.A).

Proinflammatory cytokine, TNF- α , induced a slight proliferation increase in WT, IRloxP^{+/+} and IRB VSMCs. Moreover, Ang II y ET-1 induced proliferation increase in WT IR and IRloxP^{+/+}, but not in IRB VSMCs. On the other hand, TXA2 analogue (U46619) induced a significant proliferation increase exclusively in IRA VSMCs. Furthermore, all the

TXA2 (U46619) indujo un aumento significativo de la proliferación exclusivamente en IRA VSMCs. Además, todos los estímulos proaterogénicos estudiados indujeron un aumento significativo de la proliferación en las células IRA VSMCs (Figura 5.13.A).

Adicionalmente, las células fueron también pretratadas con inhibidores de la vía ERK-MAPK (U0126) y p38-MAPK (SB20358) durante 1 hora previa a la estimulación con TNF- α (10ng/ml) durante 24 horas. Se encontró que ambos inhibidores disminuían significativamente la proliferación inducida por TNF- α en todas las líneas celulares, pero especialmente en IRA VSMCs. Estos resultados sugieren que la vía de ERK-MAPK está implicada en la proliferación de las células de músculo liso vascular especialmente en las que sólo expresan la isoforma IRA por estimulación con TNF- α (Figura 5.13.B).

Mediante ensayos de viabilidad celular, se confirmó el aumento de la proliferación de las células de músculo liso vascular inducida por TNF- α encontrado por BrdU (Figura 5.13.A). Las células fueron estimuladas con TNF- α (10ng/ml) durante 42 horas y las células viables fueron pasadas por un contador tipo CASY. Se observó que el aumento inducido por TNF- α fue especialmente significativo en las líneas celulares IRloxP+/+ e IRA VSMCs. Sin embargo, el TNF- α no parece inducir la proliferación de las células IRB VSMCs. Igualmente, la proliferación en la línea IRB VSMCs disminuye con respecto al control y es inferior que en las IRloxP+/+ e IR-/- VSMCs. Estos resultados podrían sugerir que el TNF- α afecta a la viabilidad de las IRB VSMCs al disminuir su proliferación (Figura 5.13.C).

proatherogenic stimuli studied induced a significant proliferation increase in IRA VSMCs.

In addition, the cells were pretreated with ERK-MAPK (U0126) and p38-MAPK (SB20358) inhibitors for 1 hour. Then, these cells were incubated with TNF- α (10 ng/ml), for 24 hours. It was observed that both inhibitors significantly decreased the proliferation induced by TNF- α in each cells lines and especially in IRA VSMCs. These results strongly suggest that ERK-MAPK pathway plays a role in the vascular smooth muscle cells proliferation, and particularly in overexpressing isoform IRA cells after TNF-stimulation (Figure 5.13.B).

By cell viability studies, we confirmed the results obtained in VSMCs proliferation by BrdU induced by TNF- α (Figure 5.13.A). Cells were stimulated with TNF- α (10ng/ml) for 42 hours and viable cells were passed by cell counter CASY. We observed that the increase induced by TNF- α was especially significant in IRloxP+/+ and IRA VSMCs. However, TNF- α did not induce IR VSMCs proliferation. Equally, the proliferation in IRB VSMCs decrease in relation to control and it is less than in IRloxP+/+ and IR-/- VSMCs. These results might suggest that TNF- α affect cell viability in IRB VSMCs due to this cytokine induce a decrease of its proliferation (Figure 5.13.C).

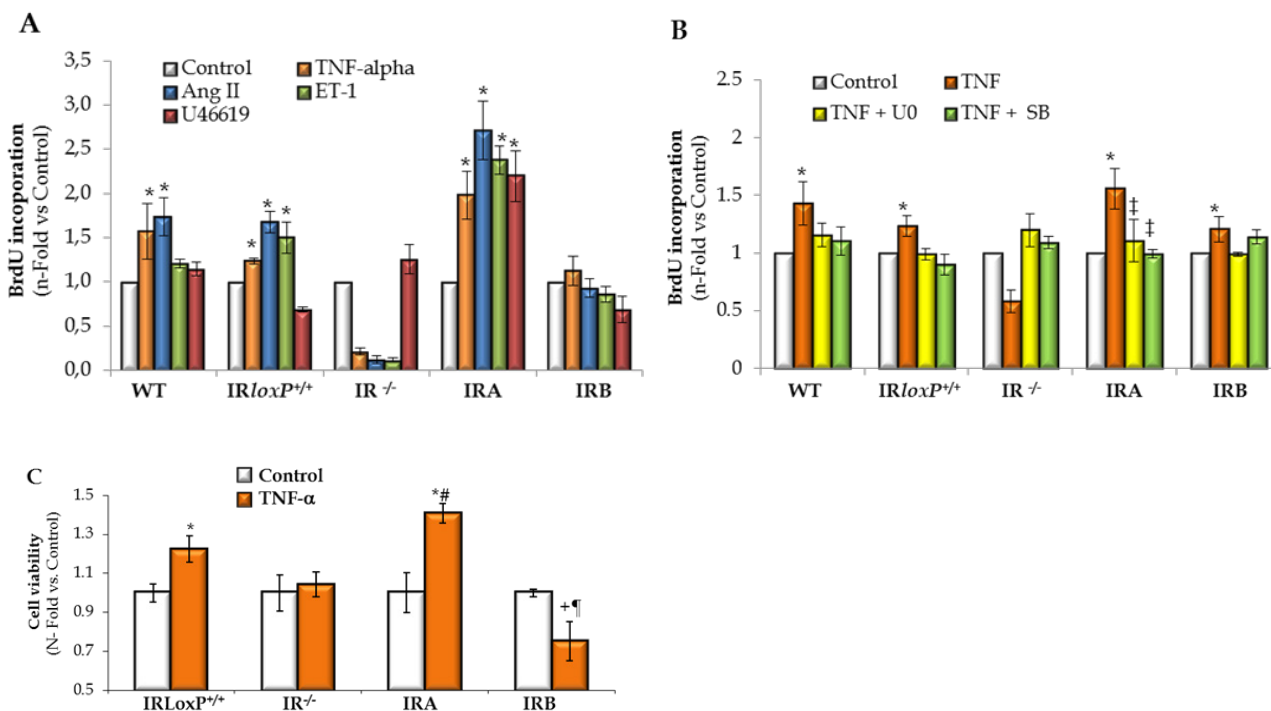


Figura 5.13. Estudio de la proliferación en respuesta a estímulos proaterogénicos en las células de músculo liso vascular. A. Tasas de proliferación en respuesta a TNF- α (10ng/ml), Ang II (10-6 M), ET-1 (10-8M) y U46619 (10-4 M). Líneas celulares IRWT, IRloxP+/+, IR-/-, IRA e IRB a 24h medida por la incorporación de BrdU. * $p < 0.05$ vs. cada control B. Efecto del pretratamiento con inhibidores de ERK-MAPK (U0126) o inhibidor de p38-MAPK (SB20358) sobre las tasas de proliferación inducida por TNF- α en líneas VSMCs. * $p < 0.05$ vs de control; ‡ $p < 0.05$ vs estímulos C. Experimentos de viabilidad celular realizados en contador celular CASY, donde las células fueron estimuladas con TNF- α a 10ng/ml durante 42 horas. * $p < 0.05$ vs. cada control; + $p < 0.05$ vs. IRloxP+/+; ¶ $p < 0.05$ vs. IR-/-; # $p < 0.05$ vs. IRB. Todos los experimentos se realizaron por lo menos 4 veces.

Del mismo modo que se han realizado los estudios de proliferación con el TNF- α , las diferentes líneas celulares fueron tratadas durante 24h con los otros estímulos aterogénicos escogidos (AngII, ET-1 o U46619), en ausencia o presencia de los inhibidores de las vías ERK-MAPK y p38-MAPK y se analizó la proliferación por BrdU (Figura 5.14.A, B, y C). Se confirmó que Ang II, ET-1 y el análogo del TXA2 (U46619) inducían la proliferación en las células de músculo liso vascular. Estos estímulos indujeron especialmente un aumento de la tasa de proliferación en las IRA VSMCs.

Figure 5.13. Proliferation assay in response to proatherogenic stimuli in vascular smooth muscle cells. A. Rates of proliferation in response to TNF- α (10ng/ml), Ang II (10-6 M), ET-1 (10-8M) and U46619 (10-4 M). IRWT, IRloxP+/+, IR-/-, IRA and IRB at 24h measured by BrdU incorporation. * $p < 0.05$ vs. each control B. Effect of pretreatment with inhibitors of ERK-MAPK (U0126) or p38-MAPK inhibitor (SB20358) pathway on the proliferation rate induced by TNF- α 10ng/ml in VSMC lines. * $p < 0.05$ vs. control; ‡ $p < 0.05$ vs. stimuli. C. Cell viability experiments performed by CASY cell counter, where cells were stimulated with 10ng/ml TNF- α for 24 hours. * $p < 0.05$ vs. each control; + $p < 0.05$ vs. IRloxP+/+; ¶ $p < 0.05$ vs. IR-/- and # $p < 0.05$ vs. IRB. All experiments were performed at least 4 times.

Cells from each cells lines were treated with Ang II (10-6 M), ET-1 (10-8M) or U46619 (10-4 M) during 24 hours, in the presence or absence of ERK-MAPK and p38-MAPK pathway inhibitors. Then, BrdU proliferation assays were realized (Figure 5.14.A, B, y C). It was confirmed that Ang II, ET-1 and TXA2 analogue (U46619) induced proliferation in vascular smooth muscle cells. These stimuli specially induced an increase of IRA VSMCs proliferation rate. Similarly, it was observed that both inhibitors significantly decrease cell

Asimismo, se encontró que ambos inhibidores disminuían significativamente la proliferación celular inducida por todos los estímulos proaterogénicos, como previamente habíamos visto con el TNF- α . Estos resultados sugieren fuertemente la participación de las vías de señalización de p38 y ERK-MAPK, inducida por estímulos proaterogénicos, tales como TNF- α , Ang II, ET-1, y U46619 en la proliferación de las células de músculo liso vascular y especialmente de IRA VSMCs.

proliferation induced by all proatherogenic stimuli, as it happened with TNF- α . These results strongly suggest that p38 and ERK-MAPK signalling pathways involvement, (induced by proatherogenic stimuli, such as TNF- α , la Ang II, ET-1, and U46619) in vascular smooth muscle cells proliferation, and particularly important in IRA VSMCs.

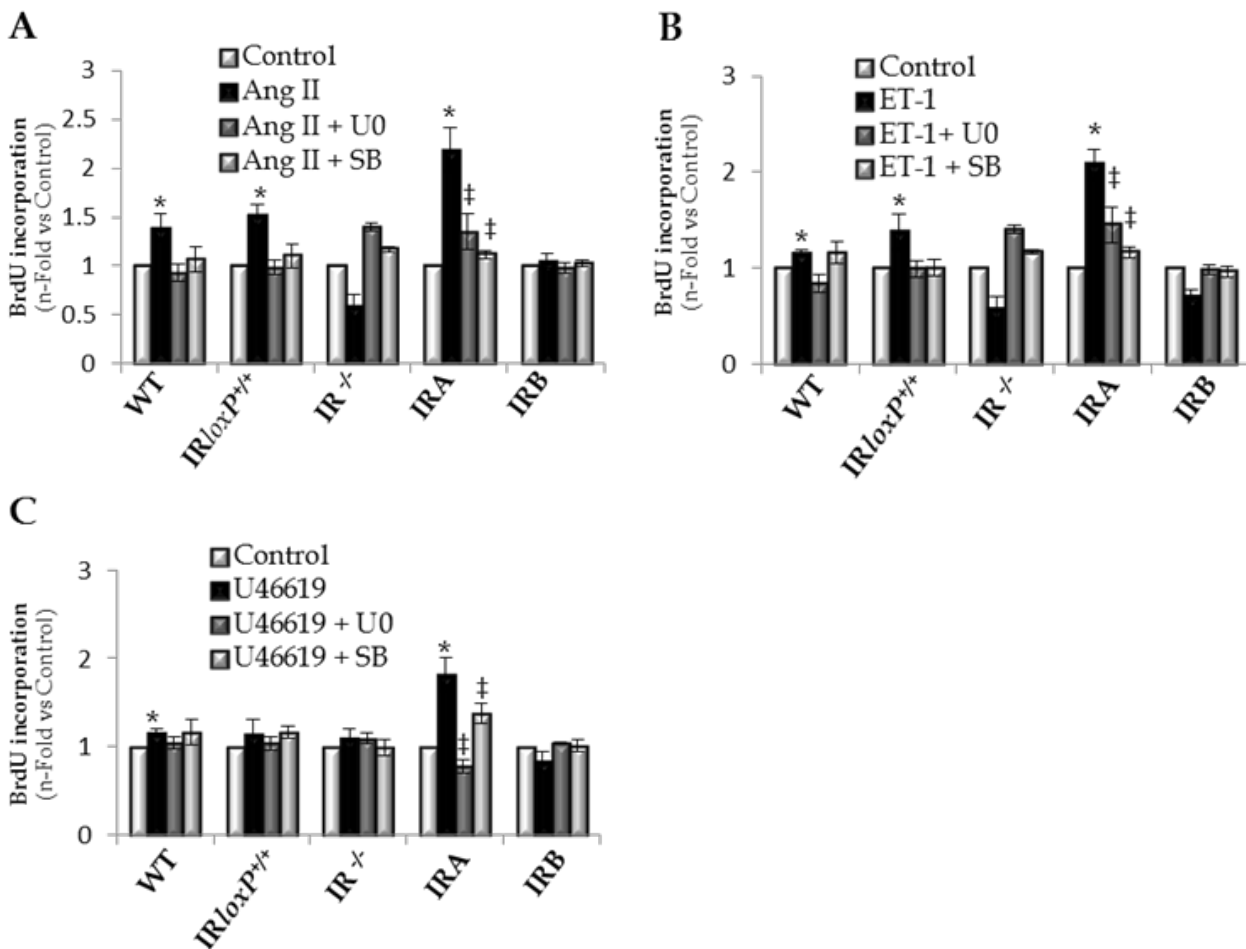


Figura 5.14. Efecto de los inhibidores de la vía MAPK en la proliferación de VSMCs inducida por estímulos proaterogénicos. Todos los ensayos se realizaron por incorporación de BrdU y se utilizaron como inhibidores, U0126 (UO, inhibidor de ERK-MAPK) y SB20358 (SB, inhibidor de p38-MAPK). A. Estimulación con AngII (10⁻⁶ M); AngII (10⁻⁶ M) + UO; y AngII (10⁻⁶ M) + SB. B. Estimulación con ET-1 (10⁻⁸ M); ET-1 (10⁻⁸ M) + UO; y ET-1 (10⁻⁸ M) + SB. C. Estimulación con U46619 (10⁻⁴ M); U46619 (10⁻⁴ M) + UO; y U46619 (10⁻⁴ M) + SB. **p* < 0.05 vs. control; ‡*p* < 0.05 vs. estímulos.

Figure 5.14. Effect of inhibitors of the MAPK pathway in VSMC proliferation induced by pro-atherogenic stimuli. All tests were performed and BrdU incorporation and there was used as inhibitor, U0126 (UO) inhibitor ERK-MAPK and SB20358 (SB) inhibitor of p38-MAPK. A. Stimulation with Ang II (10⁻⁶ M); Ang II (10⁻⁶ M) + UO; y Ang II (10⁻⁶ M) + SB. B. Stimulation with ET-1 (10⁻⁸ M); ET-1 (10⁻⁸ M) + UO; y ET-1 (10⁻⁸ M) + SB. C. Stimulation with U46619 (10⁻⁴ M); U46619 (10⁻⁴ M) + UO; y U46619 (10⁻⁴ M) + SB. **p* < 0.05 vs. control; ‡*p* < 0.05 vs. stimuli.

5.1.4. Asociación diferencial de las isoformas del IR con los receptores proaterogénicos en células de músculo liso vascular

Anteriormente, se ha demostrado que TNF- α , Ang II, ET-1 y U46619 inducen un aumento de la proliferación mayoritariamente en células que expresan sólo la isoforma IRA, en comparación con las células IRB VSMCs (Figura 5.13.A). Para evaluar si este aumento diferencial en la proliferación se debía a que las líneas IRA e IRB VSMCs tuvieran diferentes niveles de expresión de los receptores para los estímulos proaterogénicos, se analizó por Western blot, los niveles de proteína de los receptores de TNF- α (TNF-R1 y TNF-R2), de AngII (AT-1), de ET-1 (ET-A) y del TXA2 (TP) (Figura 5.15).

Se observó que las células IRA VSMCs presentan mayor expresión de los receptores AT-1, ET-A y TP que las células IRB VSMCs. Esta diferencia de expresión de los tres receptores podría explicar, al menos en parte, el aumento de la proliferación en IRA VSMCs con respecto a IRB VSMCs inducida por AngII, ET-1 o el TXA2. Sin embargo, la expresión de TNF-R1 o TNF-R2 fue muy similar en ambas líneas celulares (Figura 5.15).

5.1.4 Differential association between IR isoforms and proatherogenic receptors in vascular smooth muscle cells

Previously, it was demonstrated TNF- α , Ang II, ET-1 and U46619 induce a proliferation increase mainly in cells overexpressing IRA isoform compared with IRB VSMCs (Figure 13A). To test whether this differential increase in proliferation between IRA and IRB VSMCs was for the different expression levels of the receptors for the proatherogenic stimuli, we analysed protein levels of the TNF- α (TNF-R1 and TNF-R2), AngII (AT-1), ET-1 (ET-A) and TXA2 (TP) receptors by Western blot (Figure 5.15).

It was observed that the IRA VSMCs cells exhibit higher expression of the AT-1, ET-A and TP receptors than IRB VSMCs. This difference in expression of the three receptors may explain, at least in part, the enhanced proliferation in IRA VSMCs regarding IRB VSMCs induced by AngII, ET-1 or TXA2. However, the expression of TNF-R1 or TNF-R2 was similar in both cell lines (Figure 5.15).

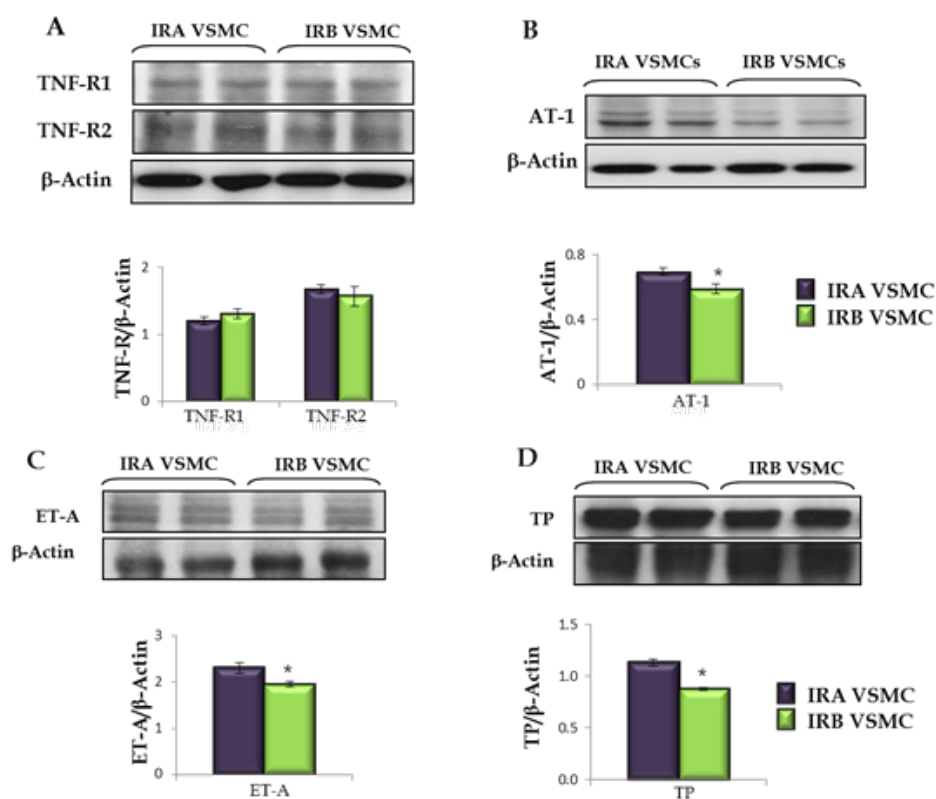


Figura 5.15. Western blot de los niveles proteicos de los receptores para moléculas proaterogénicas en las células IRA e IRB VSMCs. A. Niveles de receptores TNF-R1 y TNF-R2 para TNF- α . B. Niveles del receptor AT-1 para la angiotensina II. C. Niveles del receptor ET-A para la ET-1. D. Niveles del receptor TP para el análogo del Tromboxano A2. * $p < 0.05$ vs. IRA VSMCs. Todos los ensayos se realizaron un mínimo de tres veces.

Figure 5.15. Western blot analysis of protein levels of the proatherogenic receptors molecules in IRA and IRB VSMCs. A. Levels of TNF-R1 and TNF-R2 receptors for TNF- α . B. Levels of AT-1 receptor for angiotensin II. C. Levels of the ET-A receptor for endothelin-1. D. Levels of TP receptor for thromboxane A2 analogue. * $p < 0.05$ vs. IRA VSMCs. All testing were performed minimum three times.

Debido a que los niveles de receptores para el TNF- α , (TNF-R1 y TNF-R2) fueron muy similares en ambas líneas celulares, se planteó la posible existencia de una asociación diferencial entre las isoformas del IR y los receptores de TNF- α . Igualmente, se planteó que esta asociación podría estar favorecida por el ligando. Esto podría explicar el efecto diferencial del TNF- α sobre ambas líneas celulares IRA e IRB VSMCs.

En primer lugar, las células fueron estimuladas con TNF- α durante 6, 18 y 24 horas. Posteriormente, se realizaron inmunoprecipitaciones con TNF-R1 o TNF-R2 y se valoró la asociación de cada isoforma del IR con los receptores de TNF- α por Western blot frente a IR β (Figura

As TNF- α receptors (TNF-R1 y TNF-R2) levels were really similar for both cells lines, the possible existence of a differential association between IR isoforms and TNF- α receptors was considered. Likewise, it was planned that ligand might facilitate this association. It may explain that the TNF- α differential effect on IRA and IRB VSMCs.

First, cells were stimulated with TNF- α for 6, 18 and 24 hours. Then, immunoprecipitations with TNF-R1 or TNF-R2 were carried out. Its association with TNF- α receptors were assessed by Western blot (Figure 5.16). It showed that IRA basal association with TNF-R1. This association increases with TNF- α treatment in the time, getting the maximum increase at 18 hours. However the association decreased

ra 5.16). Se observó, que IRA tiene una asociación basal con TNF-R1 y además aumenta cuando las células son tratadas con TNF- α de manera dependiente del tiempo hasta las 18 horas, y finalmente disminuye a las 24 h (Figura 5.16.A). También, se observó que en las IRA VSMCs existía una fuerte asociación basal del TNF-R2 con el receptor de la insulina, que fue disminuyendo progresivamente al ser tratadas con el TNF- α (Figura 5.16.B). Sin embargo, en las células IRB VSMCs no existe asociación del IR con los receptores TNF-R1 y TNF-R2, ni de forma basal, ni inducida por el TNF- α a distintos tiempos (Figura 5.16).

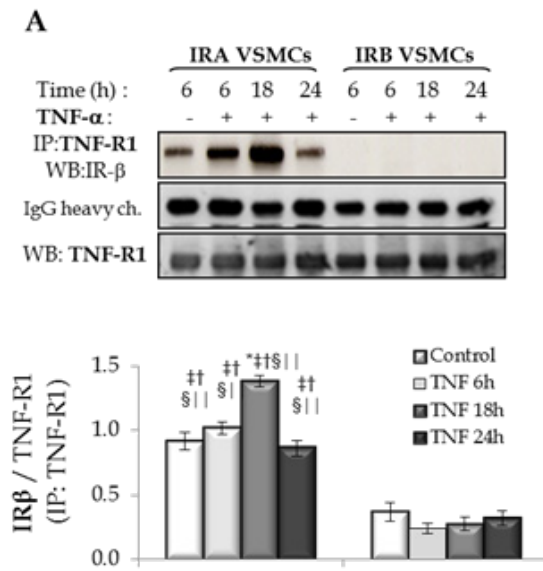


Figura 5.16. Asociación entre el IR con los receptores de TNF- α en las líneas celulares IRA e IRB VSMCs. Geles representativos y cuantificación de la asociación IR con TNF-1R (A) o TNF-R2 (B) por estimulación con TNF- α a 6, 18 y 24h. Los experimentos se realizaron por lo menos 4 veces. * $p < 0.05$ vs. control (IRA VSMCs); ‡ $p < 0.05$ vs. control (IRB VSMCs); † $p < 0.05$ vs. 6 horas de estímulo (IRB VSMCs); § $p < 0.05$ vs. 18 horas de estímulo (IRB VSMCs); ¶ $p < 0.05$ vs. 24 h de estímulo (IRB VSMCs). IP, inmunoprecipitación; WB, Western blot.

Además, se quiso estudiar si en la línea celular que presentaba las dos isoformas del IR (IRloxP+/+) presentaba un comportamiento análogo a IRA VSMCs, dado que también se producía un aumento significativo en la proliferación inducida por el TNF- α . Para ello, se estimuló la línea celular IRloxP+/+ VSMCs con TNF- α a 10ng/ml durante 6, 18 y

at 24 hours. As well, a strong basal association was detected between IR and TNF-R2 in IRA VSMCs. This association progressively decreased with time (Figure 5.16.B). However, in IRB VSMCs there is no association between the IR with TNF-R1 or TNF-R2 receptors, neither under basal form nor induced by TNF- α at the different times (Figure 5.16).

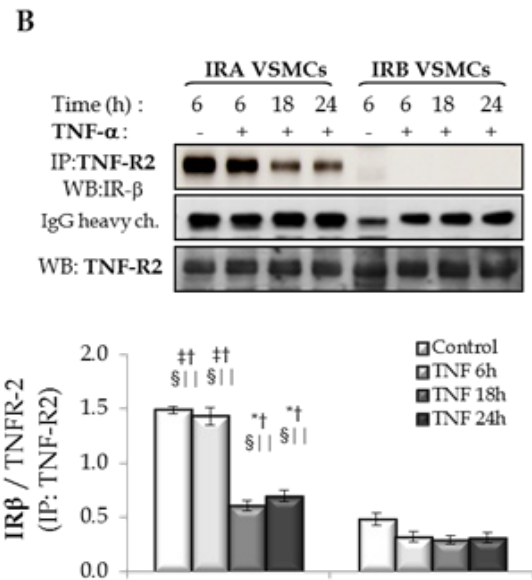


Figure 5.16. Insulin receptor and TNF- α receptors association in IRA and IRB VSMCs. Representative gels and quantification of IR association with TNF-1R (A) or TNF-R2 (B) by stimulation with TNF- α for 6, 18 and 24h. Experiments were performed at least 4 times. * $p < 0.05$ vs. control (IRA VSMCs); ‡ $p < 0.05$ vs. control (IRB VSMCs); † $p < 0.05$ vs. 6-hour stimulus (IRB VSMCs); § $p < 0.05$ vs. 18-hour stimulus (IRB VSMCs); ¶ $p < 0.05$ vs. 24-hour stimulus (IRB VSMCs). Abbreviations: IP, immunoprecipitation; WB, Western blot.

As in IRA VSMCs, a significant TNF- α -induced proliferation increase occurred in IRloxP+/+ VSMC line. For this reason, it was studied whether IRloxP+/+ behaviour was analogous to that observed with IRA VSMCs. IRloxP+/+ VSMCs was stimulated with TNF- α (10 ng/ml) for 6, 18 and 24 hours.

24 horas. A continuación, se inmunoprecipitó frente a TNF-R1, para analizar la asociación entre el receptor de alta afinidad del TNF- α y el IR en esta línea celular. Encontrándose resultados similares a los obtenidos en la línea IRA VSMCs, había una asociación basal entre TNF-R1 e IR, y ésta aumentaba con el tiempo de estimulación con TNF- α . Se encontró la máxima asociación entre los dos receptores a las 24 horas de estimulación con el TNF- α (Figura 5.17).

Then, TNF-R1 was immunoprecipitated for analysing the association between high-affinity TNF- α receptor and IR. These results were similar to the results observed in IRA VSMCs. Observations showed a basal association between TNF-R1 and IR, which increased with the TNF- α stimulation in a time-dependent manner. The maximum association between IR and TNF-1R receptors was found at 24 hours (Figure 5.17).

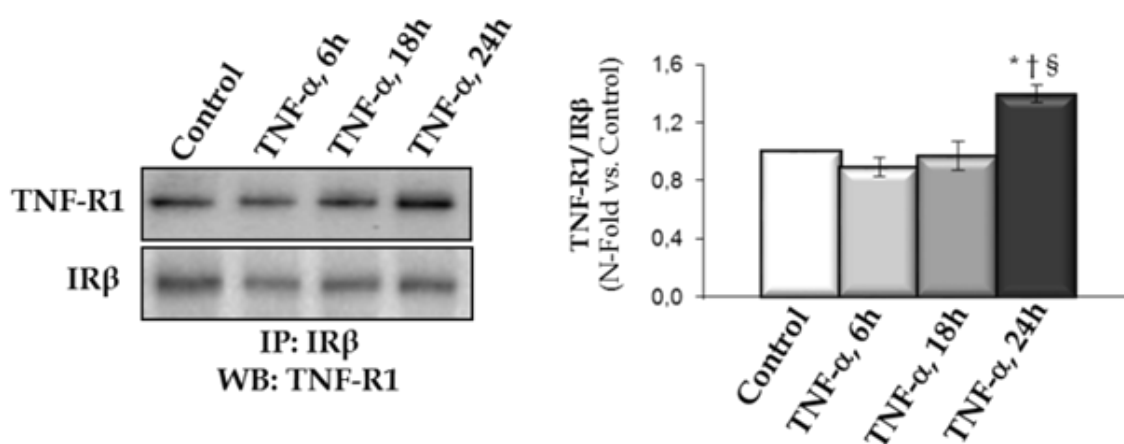


Figura 5.17. Asociación del IR y el TNF-R1 en la línea celular IRloxP+/+ VSMCs. Geles representativos y cuantificación de asociación entre TNF-R1 con IR en respuesta a TNF- α en una manera dependiente del tiempo. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. TNF- α a las 6h; § $p < 0.05$ vs. TNF- α a las 18h.

Figure 5.17. Insulin receptor and TNF-R1 receptor association in IRloxP+/+ VSMCs. Representative gels and quantification of TNF-R1 association with IR in response to TNF- α in a time-dependent manner. Experiments were performed at least times. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. TNF- α 6h; § $p < 0.05$ vs. TNF- α 18h.

Igualmente, se estableció la relación del receptor de la insulina con otros receptores proaterogénicos. Se realizaron inmunoprecipitaciones con los distintos anticuerpos que reconocen a los receptores proaterogénicos, receptor de Ang II (AT-1), de ET-1 (ET-A) y del tromboxano A2 (TP). Posteriormente, se realizaron Western blots frente al IR. De esta manera, se podía valorar la asociación entre AT-1, ET-A y TP con IR, de manera basal y dependiente de estímulo. La asociación en respuesta a AngII, ET-1 y U46619, se evaluó a las 6, 18 y 24 horas (Figura 5.18).

To the same extent, a relationship between insulin receptor and others proatherogenic receptors was established. Immunoprecipitations were run with the various antibodies that recognise proatherogenic receptors (I.e. Ang II (AT-1), ET-1 (ET-A) and thromboxane A2 (TP) receptors. Subsequently, Western blot against the IR were carried out. This way, the association between AT-1, ET-A, TP and the insulin receptor could be evaluated under basal conditions and depending on the stimuli. Association in response to Ang II, ET-1 y U46619 was assessed at 6, 18 and 24 hours (Figure 5.18).

Se observó, que las células IRA VSMCs presentan asociación basal entre el IR y los receptores AT-1 y TP. Esta asociación basal, disminuyó tras la estimulación con angiotensina II y el análogo del tromboxano A2. Sin embargo, en las células IRB VSMCs, no se observó asociación entre IR y AT-1 o TP, ni de forma basal ni después de ser estimuladas con AngII o U46619, respectivamente (Figura 5.18.A y C). En contraposición, se observó asociación basal del IR con el receptor para ET-1, tanto en las células IRA como IRB VSMCs; sin embargo los niveles de asociación del IR con ET-A fueron mucho mayores en las células IRA VSMCs que en las IRB VSMCs (Figura 5.18.B). También, se observó que estas asociaciones disminuyeron progresivamente después de la estimulación con U46619 (Figura 5.18.B).

It was observed that IRA VSMCs showed basal association between the IR and AT-1 and TP receptors. This basal association significantly decreased after stimulation with angiotensin II and thromboxane A2 analogue. On the opposite, in IRB VSMCs, no association was noticed between IR-AT-1 or with IR-TP, neither in a basal form nor after stimulation with AngII or U46619 (Figure 5.18.A and C). In contrast, an IR basal association with the receptor for ET-1 was observed in IRA as well as in IRB VSMCs. However, basal association between IR and ET-A was observed in IRA vs. in IRB VSMCs, being were much higher in IRA VSMCs than in IRB VSMCs (Figure 5.18.B). Additionally, it was noticed that these associations decreased progressively following stimulation with U46619 (Figure 5.18.B).

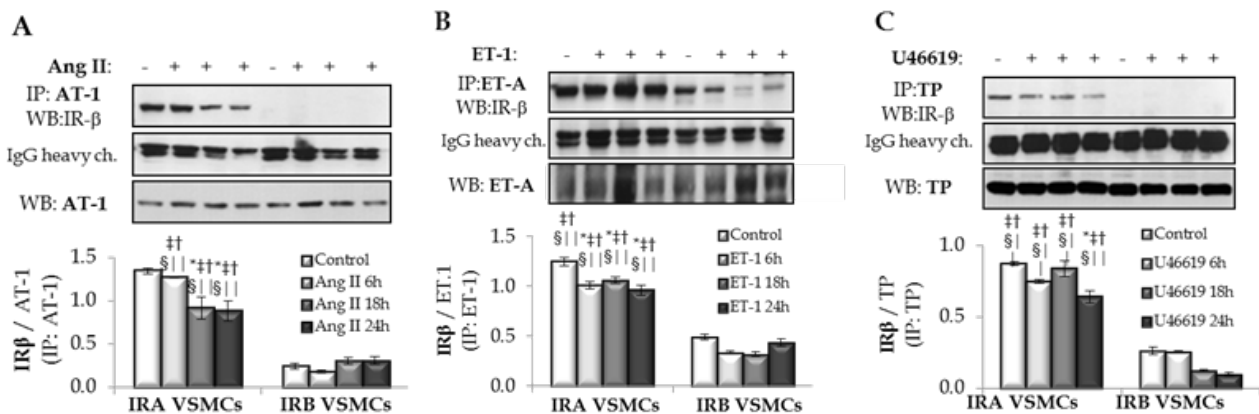


Figura 5.18. Asociación entre IR y diferentes receptores para estímulos proaterogénicos en las células IRA e IRB VSMCs. Geles representativos y gráficas de la cuantificación de la asociación del IR con los receptores proaterogénicos en respuesta a estímulo de manera dependiente del tiempo. A. Estimulación con AngII; IP: receptor (AT-1); WB: IRβ-AT-1. B. Estimulación con ET-1; IP: receptor (ET-A); WB: IRβ-ET-A. C. Estimulación con TXA2; IP: receptor (TP). WB: IRβ-TP. Los experimentos se realizaron al menos cuatro veces. * $p < 0.05$ vs. control (IRA VSMCs); ‡ $p < 0.05$ vs. control (IRB VSMCs); † $p < 0.05$ vs. 6h de estímulos (IRB VSMCs); § $p < 0.05$ vs. 18h de estímulos (IRB VSMCs); ¶ $p < 0.05$ vs. 24h de estímulos (IRB VSMCs). Abreviaturas: IP, inmunoprecipitación; WB, Western blot.

Figure 5.18. IR and proatherogenic receptors association in the IRA and IRB VSMCs. Representative gels and quantification of the association of IR with proatherogenic receptors in response to stimulation, a time-dependent manner. A. Stimulation with Ang II; IP: receptor (AT-1); WB: IRβ-AT-1. B. Stimulation with ET-1; IP: receptor (ET-A); WB: IRβ-ET-A. C. Stimulation with TXA2; IP: receptor (TP); WB: IRβ-TP. Experiments were performed at least four times. * $p < 0.05$ versus control (IRA VSMCs); ‡ $p < 0.05$ vs Control (IRB VSMCs); † $p < 0.05$ vs. 6h stimuli (IRB VSMCs); § $p < 0.05$ vs. 18h stimuli (IRB VSMCs); ¶ $p < 0.05$ vs. 24h stimuli (IRB VSMCs). Abbreviations: IP, immunoprecipitation; WB, Western blot.

5.1.5. La expresión de la isoforma IRA y TNF-R1 está aumentada en la aorta de ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO

5.1.5. Expression of the IRA and TNF-R1 isoform is increased in the aorta from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice

5.1.5.1. Caracterización del modelo ApoE^{-/-} de 24 semanas

5.1.5.1. Characterization of 24-week-old ApoE^{-/-} model

Para caracterizar este primer modelo experimental, en primer lugar, se midieron distintos parámetros como el peso corporal, los ratios de la masa del tejido adiposo marrón y blanco (BAT y WAT) respecto al peso corporal. Se observó, que el modelo ApoE^{-/-} de 24 semanas no presentaba diferencias significativas del peso corporal, ni en los ratios WAT (mg)/Peso corporal (g) como en BAT (mg)/Peso corporal (g) con respecto a los animales control de tipo silvestre (WT) (Figura 5.19A). En segundo lugar, se midieron las concentraciones plasmáticas de colesterol (CH) y triglicéridos (TG) para comprobar que habíamos generado un ratón ApoE^{-/-} con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Se encontró que ambos parámetros estaban aumentados significativamente en el ratón ApoE^{-/-} de 24 semanas comparado con los ratones control (Figura 5.19.B).

In first place, to characterize this first experimental model, various parameters as body weight, brown and white adipose tissue mass rates compared to body weight (BAT and WAT) were measured. It was observed 24-week-old ApoE^{-/-} mice did not show significant differences neither in body weight nor in WAT (mg)/Body weight (g) nor in BAT (mg)/Body weight (g) (Figure 5.19.A). Secondly, cholesterol (CH) and triglyceride (TG) plasma concentrations were quantified to verify ApoE^{-/-} mouse with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. It was observed that both parameters were higher in 24 week-old ApoE^{-/-} compared with control mice (Figure 5.19.B).

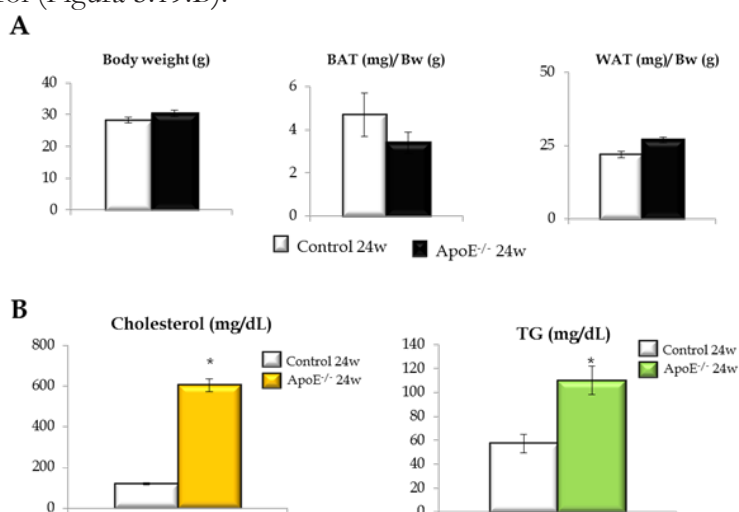


Figura 5.19. Caracterización del modelo animal ApoE^{-/-}. Perfil metabólico de ratones ApoE^{-/-} y Controles de 24 semanas. *p<0.05 versus control. A. Mediciones de peso corporal, BAT y WAT. B. Mediciones de colesterol y triglicéridos.

Figure 5.19. ApoE^{-/-} animal model characterization. Metabolic profile of 24-week-old ApoE^{-/-} mice and 24-week-old Control mice. *p <0.05 vs. Control. A. Measurements of body weight, BAT and WAT. B. Measurements of cholesterol and triglycerides.

Se midieron parámetros del metabolismo de la glucosa en los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas (Figura 5.20). En primer lugar, se determinó la concentración de glucosa en sangre en ayunas, de forma instantánea, mediante el uso de un glucómetro calibrado, tanto en los animales ApoE^{-/-} de 24 semanas como en los animales control (Figura 5.20.A). En segundo lugar, se realizaron mediciones de insulina plasmática postprandial, mediante un ELISA comercial de insulina (Figura 5.20.B). No se observó ningún cambio significativo con respecto al control. Igualmente se realizaron los test de tolerancia a la glucosa (GTT) y el test de tolerancia a la insulina (ITT), presentando perfiles sin ninguna alteración. En el GTT, se observó que la glucemia disminuyó hasta alcanzar aproximadamente los valores de glucemia basal antes de la dosis de glucosa. (Figura 5.20.C). Y en el ITT, se observó que los niveles de glucosa disminuyeron tras la inyección con insulina (Figura 5.19.D). Teniendo en cuenta los hallazgos en las figuras 5.19 y 5.20, podemos decir, que el ratón ApoE^{-/-} de 24 semanas presenta hipercolestestolemia e hipertrigliceridemia pero sin alteraciones en el metabolismo de la glucosa.

Different parameters from glucose metabolism were analysed in 24-week-old ApoE^{-/-} mice (Figure 5.20). First, blood glucose level in fasting ApoE^{-/-} mice at 24 week-old as well as in control mice was measured using a calibrated glucose meter (Figura 5.20.A). Subsequently, postprandial plasma insulin levels were measured using an insulin ELISA kit (Figure 5.20.B). No significant change was observed in comparison with the control group. In addition, glucose tolerance tests (GTT) and insulin tolerance tests (ITT) were run, presenting profiles without any alteration. In GTT, it was observed glycemia decreased and approximately reached the basal glycemia level before the glucose dose (Figure 5.20.C). In ITT, glucose levels lowered after insulin injection (Figure 5.20.D). The results observed in figures 5.19 and 5.20 showed that 24-week-old ApoE^{-/-} mice present hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia without alterations in glucose metabolism.

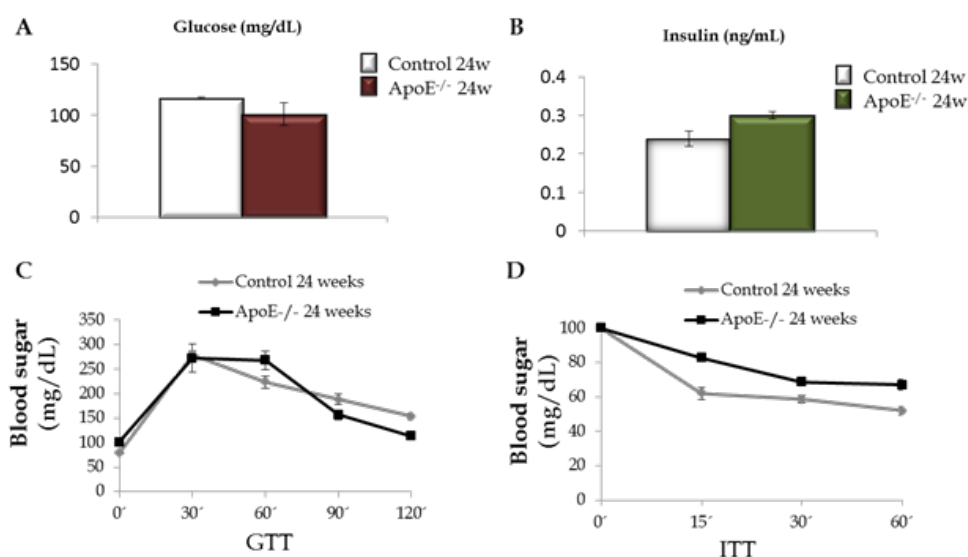


Figura 5.20. Caracterización del modelo animal ApoE^{-/-}. Estudio de algunos parámetros del metabolismo de la glucosa en ratones ApoE^{-/-} y controles de 24 semanas. A. Mediciones de la glucosa plasmática. B. Mediciones de insulina plasmática. C. Test de tolerancia a la Glucosa (GTT). D. Test de tolerancia a la insulina (ITT).

Figure 5.20. ApoE^{-/-} animal model characterization. Glucose metabolism parameters in 24-week-old ApoE^{-/-} mice and controls. A. Measurement of plasma glucose. B. Measurement of plasma insulin. C. Glucose tolerance test (GTT). D. Insulin tolerance test (ITT).

Se escogió el modelo ApoE^{-/-} porque es un modelo clásico de dislipidemia que desarrolla, de forma espontánea o con una dieta rica en grasas, lesiones ateroscleróticas parecidas a las humanas. Por ello, estudiamos los niveles de IRA y TNF-R1 en la aorta de estos ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas para poder valorar el papel del IRA y TNF-R1 en la progresión de lesiones ateroscleróticas.

En primer lugar, caracterizamos las lesiones ateroscleróticas estudiando la acumulación lipídica, el área de lesión, el infiltrado de macrófagos y la proliferación en los arcos aórticos de ratones ApoE^{-/-} y ratones controles de 24 semanas (Figura 5.21). Se analizaron los depósitos de lípidos mediante tinción de Oil-Red, la infiltración de macrófagos por inmunohistoquímica para F4/80, la presencia de las VSMCs y la proliferación de las mismas mediante inmunohistoquímica para α -SMA y PCNA, respectivamente. Los ratones ApoE^{-/-} presentaron mayor acumulación lipídica, mayor área de lesión, mayor infiltrado de macrófagos y un aumento en la proliferación de las VSMCs en los arcos aórticos comparados con el grupo control del 24 semanas (Figura 5.21.A y B).

ApoE^{-/-} mice is a classical animal model of dyslipidemia: it develops, spontaneously or with a fat-rich diet, atherosclerotic lesions similar to that observed in humans. For it, we studied IRA y TNF-R1 levels in the aorta from 24-week-old ApoE^{-/-} mice to be able to value the role of IRA and TNF-R1 in atherosclerotic lesions progression.

Firstly, atherosclerotic lesions were characterized by study of lipid accumulation, lesion area, macrophage infiltration and the proliferation in aortic roots from ApoE^{-/-} mice fed occidental diet and 24-week-old control mice (Figure 5.21). Lipid depots were analysed using Oil-Red staining, macrophage infiltration with F4/80 immunohistochemical staining and VSMCs presence and proliferation through α -SMA and PCNA immunohistochemistry, respectively. ApoE^{-/-} mice showed larger lipid depots and higher lesion area, higher macrophage infiltration and a proliferation increase of VSMCs in the aortic roots compared to 24-week-old control (Figure 5.21.A and B).

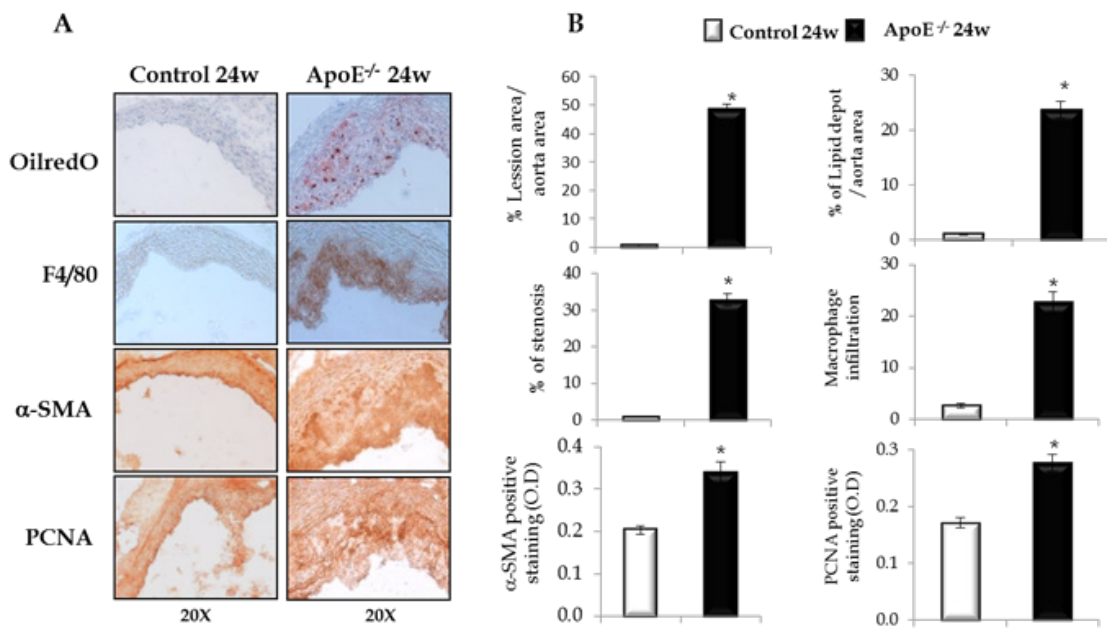


Figura 5.21. Caracterización del modelo animal ApoE^{-/-}. Lesión aterosclerótica de ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas bajo dieta grasa comparado con controles de 24 semanas. A. Medida del depósito de lípidos (panel superior), infiltración de macrófagos (segunda línea de paneles), presencia de VSMCs (tercera línea de paneles) y proliferación (última línea de paneles) en los arcos aórticos de ratones controles (paneles de la izquierda) y ApoE^{-/-} de 24 semanas (paneles de la derecha). B. Gráficos: (% área de lesión / área de aorta), (% de acumulación lipídica / área de la aorta), (% de estenosis), (% del área de infiltrado de macrófagos), (tinción positiva de α-SMA) y (tinción positiva de PCNA).

Figure 5.21. ApoE^{-/-} animal model characterization. Atherosclerotic lesion of ApoE^{-/-} mice at 24 week-old under Western diet compared to 24-week-old control mice. A. Measure of lipid depots (upper panels), macrophage infiltration (second line of panels), VSMCs presence (third line of panels) and proliferation (last line of panels) on aortic roots from Control and ApoE^{-/-} mice. B. Graphics: (% lesion area/aorta area), (% of lipid depot/aorta area), (% of stenosis), (% of macrophage infiltration), (α-SMA positive staining) and (PCNA positive staining).

Se realizó una doble tinción de los arcos aórticos con α-SMA (por inmunohistoquímica) y PCNA (por inmunofluorescencia) con el fin de confirmar la proliferación de las VSMCs en el arco aórtico del ratón ApoE^{-/-}. Además, los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Debido a la colocalización de las proteínas en la aorta, se pudo confirmar que el modelo ApoE^{-/-} presentaba un aumento en la proliferación de las células de músculo liso vascular, incrementando así el área de la lesión, comparado con el control 24 semanas (Figura 5.22).

Double-staining immunohistochemistry for α-SMA and PCNA was performed in order to confirm VSMCs proliferation in ApoE^{-/-} mice aortic roots. Besides, cell nuclei were DAPI-stained. Thanks to protein co-localization in the aorta, it was possible to confirm ApoE^{-/-} model presented an increase in vascular smooth muscle cells proliferation, increasing the area of lesion compared to 24 week-old control mice (Figure 5.22).

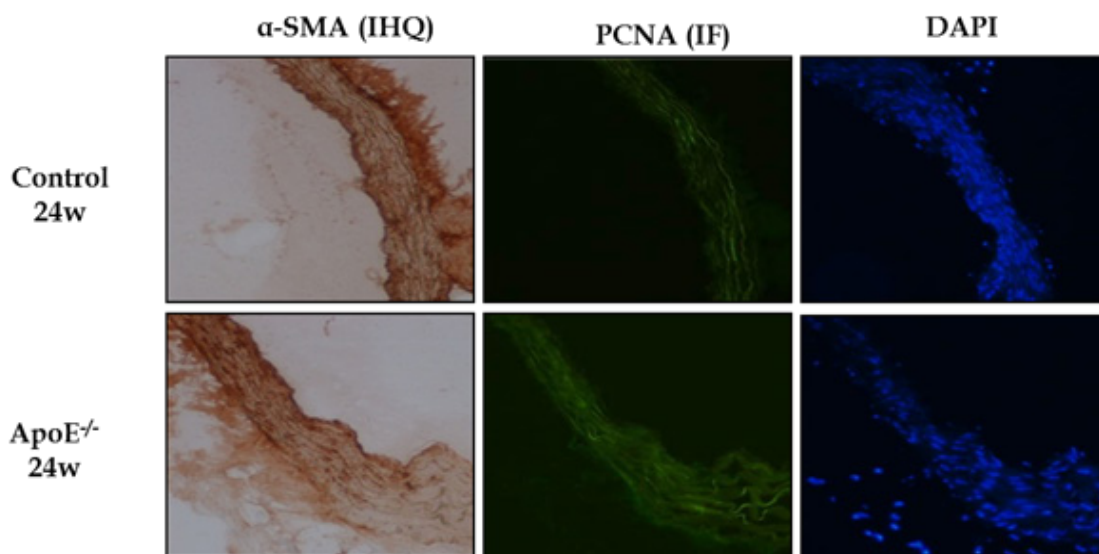


Figura 5.22. Caracterización del modelo animal ApoE^{-/-}. La colocación de células músculo liso vascular (α -SMC) con PCNA en el arco aórtico. Las células de músculo liso vascular se detectaron mediante inmunohistoquímica (tinción marrón) y la expresión de PCNA por inmunofluorescencia (tinción verde). DAPI se utilizó para localizar los núcleos de las células (tinción azul).

Por qRT-PCR, se analizaron los niveles de expresión de los genes que codifican para ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α y PAI-1 en aortas de ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas bajo dieta occidental. Se observó que los niveles del mRNA para todos los genes estudiados se encontraban significativamente aumentados en la aorta del ratón ApoE^{-/-} en comparación con el grupo control. Los niveles más altos del mensajero se encontraron para el gen TNF- α (Figura 5.23). El aumento de mensajeros en la aorta de los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas son posibles indicadores del inicio de un proceso inflamatorio y una posible pérdida de la función endotelial.

Figure 5.22. ApoE^{-/-} animal model characterization. Vascular smooth muscle cells (α -SMC) and PCNA colocalization in aortic roots. VSMCs were detected by immunohistochemistry (brown staining) and PCNA expression by immunofluorescence (green staining). DAPI staining was used to localize nuclei of cells (blue staining).

The expression levels of the genes codifying for ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α and PAI-1 in aortas from 24-week-old ApoE^{-/-} mice fed occidental diet were analyzed by qRT-PCR. It was observed that studied genes mRNA expression was significantly higher in aorta from ApoE^{-/-} mice than in the control group. The highest level of mRNA was found for TNF- α gene (Figure 5.23). The increase of messenger RNA in aorta of 24-week-old ApoE^{-/-} mice may be an indicator of the beginning of an inflammatory process and a possible loss of endothelial function.

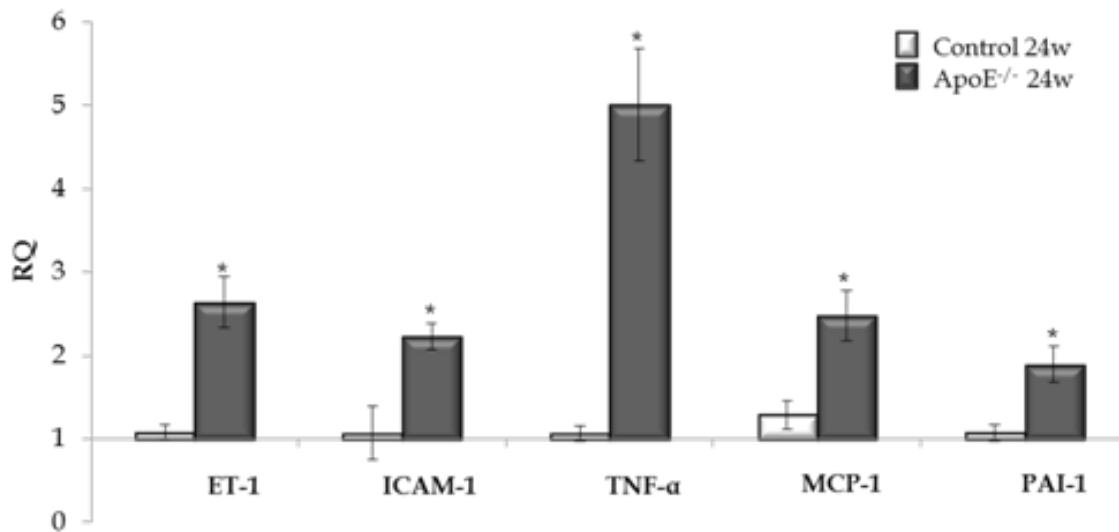


Figura 5.23. Caracterización del modelo animal ApoE^{-/-}. Los niveles del mRNA de ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF-α y PAI-1 se analizaron mediante qRT-PCR en la arteria aorta de los controles de 24 semanas de edad (Control 24w) y de ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad (ApoE^{-/-} 24w). *p<0.05 vs. Control.

Figure 5.23. ApoE^{-/-} animal model characterization. ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF-α and PAI-1 mRNA levels were analyzed by qRT-PCR in aorta artery from 24-week-old Control (Control 24w) and 24-week-old ApoE^{-/-} mice (ApoE^{-/-} 24w). *p<0.05 vs. Control.

5.1.5.2. Caracterización del modelo BARTIRKO de 1 año

Los ratones BATIRKO debido a la supresión específica del IR en el tejido adiposo marrón, desarrollan una pérdida de la masa de dicho tejido adiposo caracterizada por una severa lipoatrofia marrón. Este hecho por sí mismo confiere susceptibilidad a la obesidad y los ratones BATIRKO de forma espontánea, bajo dieta estándar, presentan un aumento de la adiposidad visceral a las 52 semanas (Gómez-Hernández et al. 2012). En esta tesis, el modelo BATIRKO de 52 semanas fue comparada con animales de tipo silvestre tanto a las 33 como a las 52 semanas, y fueron determinados distintos parámetros como el peso corporal y las concentraciones plasmáticas de insulina y glucosa.

Adicionalmente, se analizaron parámetros relacionados con la obesidad y la inflamación como niveles de leptina y TNF-α circulantes (Tabla 5.1). Se confirmó que el modelo BATIRKO de 52 semanas presentó una ganancia de peso y un aumento estadísticamente signi-

5.1.5.2. Characterization of BATIRKO model from 1 year old

BATIRKO mice, because of the specific deletion of IR in brown adipose tissue, develop an adipose tissue mass loss characterized by severe brown lipoatrophy. This fact confers obesity-susceptibility and BATIRKO mice fed standard diet, spontaneously, showed an increase of visceral adipose tissue at 52 weeks (Gómez-Hernández et al. 2012). In this thesis, 52-week-old BATIRKO model was compared to 33-week-old and 52-week-old wild type animals. Several parameters such as body weight and plasma glucose and insulin concentrations were measured.

In addition, some inflammation and obesity-related parameters such as leptin and circulating TNF-α levels were analyzed (Table 5.1). It was confirmed that in 52-week-old BATIRKO model showed weight gain and a statistically significant increase of visceral white adipose tissue mass in comparison to the control group. Another particular characteristic of this model is the statistically significant increase of plasma leptin concentration that occurred in 52-week-old BATIRKO in comparison to the

ficativo de la masa del tejido adiposo blanco visceral comparado con los otros dos grupos control. Otra característica particular de este modelo es el aumento estadísticamente significativo de la concentración de leptina en plasma, que se produjo en los ratones BATIRKO de 52 semanas comparado con los otros grupos, el cual se correlaciona con el aumento del WAT visceral de estos animales. Además, el ratón BATIRKO de 52 semanas de edad, mostró una hipoinsulinemia e hiperglucemia en el ayuno estadísticamente significativa comparada con la de los animales control de la misma edad (Tabla 5.1).

other groups and which is related to the increase in visceral WAT observed in these animals. On top of that, 52-week-old BATIRKO showed hypoinsulinemia and hyperglycemia during the fasting period statistically significant in comparison to control animals of the same age (Table 5.1).

	Control 33 semanas	Control 52 semanas	BATIRKO 52 semanas
Peso (g)	28.9 ± 0.7	31.68 ± 0.8 *	32.88 ± 0.5 *
WAT (mg)/ peso (g)	15.5 ± 1.5	20.89 ± 2.6	40.41 ± 1.6 *‡
BAT (mg)/peso (g)	2.39 ± 0.2	3.01 ± 0.3	0.88 ± 0.02 * ‡
Insulina (ng/ml)	0.37 ± 0.08	1.86 ± 0.8 *†	0.71 ± 0.3 †
Glucosa (mg/dl)	120.7 ± 5.9	118.8 ± 3.6	145.9 ± 3.9 ‡
TNF-α (pg/ml)	6.4 ± 1.3	12.36 ± 4.5	20.4 ± 13.1 *‡
Leptina (ng/ml)	2.8 ± 0.3	3.3 ± 0.8	7.7 ± 1.3 *‡
Colesterol total (mg/dl)	82.3±6.9	88.1±7.0	69.5±4.8
Triglicéridos (mg/dl)	31.3±1.5	45.7±15	46.1±10

Tabla 5.1. Caracterización del modelo BATIRKO de 52 semanas. Análisis de algunos parámetros relacionados con el metabolismo, la obesidad y la inflamación. * $p < 0.05$ vs. Control 33 semanas; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 semanas.

Table 5.1. Characterization model BATIRKO 52 weeks. Analysis of parameters related to metabolism, obesity and inflammation. * $p < 0.05$ vs. Control 33 weeks; ‡ $p < 0.05$ vs. Control 52 weeks.

Se observó que el ratón BATIRKO a las 52 semanas presentaba niveles significativamente aumentados de TNF-α comparados con los dos grupos control (Tabla 5.1). El aumento de TNF-α circulante en los animales BATIRKO a las 52 semanas, podría estar relacionado con la secreción de adipocitocinas pro-inflamatorias por parte del tejido adiposo blanco. Debido a

It was observed that 52-week-old BATIRKO mice showed significantly higher TNF-α level than in the control groups (Table 5.1). The increase of circulating TNF-α levels observed in 52-week-old BATIRKO mice might be related to adipocytokines secretion by white adipose tissue. Because of this circulating TNF-α increase, a third group of 52-week-old BATIRKO mice treated during the last 6 weeks with

este aumento de TNF- α circulante, incluimos un tercer grupo de ratones BATIRKO de 52 semanas tratados con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α durante las seis últimas semanas.

Se encontró que los animales tratados con el anti-TNF- α presentaban una normalización de la concentración de glucosa en ayunas, incluso llegando a valores equiparables a los controles (Figura 5.24.A). Igualmente se realizó un test de tolerancia a la glucosa, en el cual fue evidente que los animales BATIRKO a las 52 semanas presentan intolerancia a la glucosa, debido a un defecto en la secreción de insulina. Esta anomalía en el metabolismo de la glucosa también fue corregida con el tratamiento anti-TNF- α (Figura 5.24.B).

anti-TNF- α monoclonal antibody was included.

It was discovered that animals treated with anti-TNF- α showed a normalization of fasting glucose concentration, even reaching levels comparable with the controls (Figure 5.24.A). Likewise, a glucose tolerance test was run. It revealed that 52-week-old BATIRKO mice presented glucose intolerance due to an insulin secretion defect. This glucose metabolism disorder was corrected by the anti-TNF- α treatment (Figure 5.24.B).

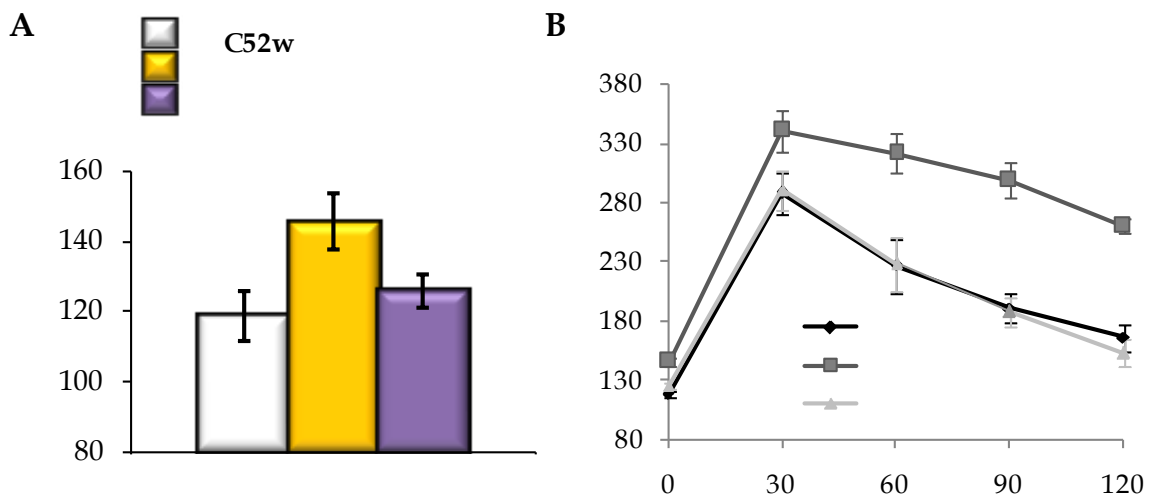


Figura 5.24. Caracterización del modelo BATIRKO de 52 semanas. A. Niveles de glucemia en ayunas de animales control de 52 semanas, BATIRKO de 52 semanas con y sin tratamiento con anti-TNF- α . * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO de 52 semanas. B. Test de tolerancia a la glucosa en los tres grupos anteriores. * $p < 0.05$ vs. Control de 52 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO de 52 semanas.

Figure 5.24. Characterization of 52-week-old BATIRKO Model. A. Glycemia basal levels in 52-week-old Control mice, 52-week-old BATIRKO mice with and without treatment with anti-TNF- α . * $p < 0.05$ vs. Control mice; † $p < 0.05$ vs. 52-week-old BATIRKO mice. B. Glucose tolerance test in the above three groups. * $p < 0.05$ vs. 52-week-old Control mice; † $p < 0.05$ vs. 52-week-old BATIRKO mice.

Anteriormente, nuestro grupo estudió que la producción de citoadipocinas por ambos tejidos adiposos podría ser la causa de las alteraciones vasculares observadas en el ratón BATIRKO de 52 semanas. Se encontró que la expresión del mRNA y los niveles de TNF- α , leptina y PAI-1 aumentaba de forma significativa en ambos tejidos adiposos. Esta

Previously, studies lead by our group revealed that adipocytokines produced by both adipose tissues may be the reason of the vascular alterations observed in 52-week-old BATIRKO mouse. It was found mRNA expression and protein levels of TNF- α , leptin and PAI-1 significantly increased in both adipose tissues. This systemic inflammation produced insulin

inflamación se encontraba a nivel sistémico y producía resistencia a la insulina en el WAT, principalmente en el compartimento gonadal y finalmente, resistencia a la insulina vascular (Gómez-Hernández et al. 2012).

Para estudiar si esta situación metabólica en el animal BATIRKO de 52 semanas ocasionaba alteraciones vasculares, más allá de la resistencia a la insulina observada, se analizó la función vascular en la arteria aorta de animales BATIRKO y control de 52 semanas. Se estudió la respuesta frente a la acetilcolina (ACh) que corresponde con la relajación dependiente de endotelio. Así, se observó que los ratones BATIRKO de 52 semanas tenían un descenso estadísticamente significativo de la vasorelajación inducida por la ACh, indicando una disfunción en el endotelio vascular (Figura 5.25).

resistencia in WAT, mainly in gonadal adipose depot and eventually vascular insulin resistance (Gómez-Hernández et al. 2012).

In order to study whether the metabolic situation of 52-week-old BATIRKO mice caused other vascular alterations in addition the vascular insulin resistance observed, the endothelial function was analysed in 52 week-old in BATIRKO and control groups. The response to acetylcholine (ACh) which corresponds to endothelium-dependent relaxation was investigated. In this way, it was observed that in 52-week-old BATIRKO mice showed a statistically significant drop of vasorelaxation induced by ACh, denoting a dysfunction in vascular endothelial (Figure 5.25).

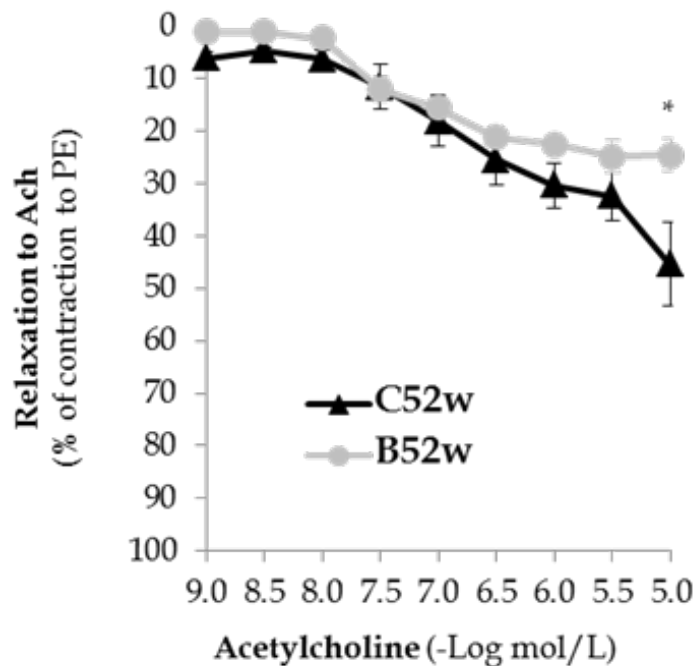


Figura 5.25. Estudio de la función endotelial del ratón BATIRKO de 52 semanas. Relajación dependiente de endotelio en respuesta a acetilcolina (ACh) en anillos aórticos previamente precontractados con fenilnefrina (PE) de BATIRKO y Control de 52 semanas de edad. * $p < 0.05$ vs. Control de 52 semanas.

Figure 5.25. Study of the endothelial function in 52-week-old BATIRKO mice. Endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine (ACh) in aortic rings precontracted with phenylephrine from BATIRKO and Control mice at 52 weeks of age. * $p < 0.05$ vs. 52-week-old Control mice.

Para valorar si además de la disfunción vascular, se producía una acumulación lipídica en la aorta, se realizó una tinción de Oil-Red contrastada con hematoxilina en los arcos aórticos

To assess if, apart from vascular dysfunction, occurred a lipid accumulation in the aorta, an Oil-Red staining contrasted with hematoxylin was carried out in the aortic roots from

de ratones BATIRKO de 52 semanas. No se observó aumento significativo de la acumulación lipídica en las aortas de animales BATIRKO de 52 semanas respecto a sus controles (Figura 5.26.A). Lo cual se correlaciona con los valores de colesterol total y triglicéridos en BATIRKO de 52 semanas semejantes a los valores de los controles (Gómez-Hernández et al. 2012).

Sin embargo, cuando se realizó la inmunohistoquímica para F4/80 en los arcos aórticos de animales BATIRKO y controles de 52 semanas, se observó una mayor infiltración de macrófagos en los arcos aórticos de ratones BATIRKO de 52 semanas en relación al grupo control (Figura 5.26.B).

Otro mecanismo potencialmente involucrado en la disfunción vascular observada en el ratón BATIRKO de 52 semanas, sería la producción de ROS y el estrés oxidativo. Se realizó una inmunohistoquímica para evaluar la producción de nitro-tirosina en los arcos aórticos, la cual fue cuantificada y se expresó con respecto al área del tejido (Figura 5.26.C). Asimismo, se detectó la producción de anión superóxido por la localización in situ de dihidroetidina (DHE) (Figura 5.26.D). Se observó, que tanto los niveles de nitro-tirosina como los del anión superóxido fueron significativamente mayores en los arcos aórticos de ratones BATIRKO de 52 semanas con respecto a sus controles.

52-week-old BATIRKO mice. No significant increase of the lipid accumulation in the aortic roots of 52-week-old BATIRKO mice compared to the control groups (Figure 5.26.A). This result matches the total cholesterol and triglycerides levels in 52-week-old BATIRKO mice similar to the respective control levels (Gómez-Hernández et al. 2012).

However, when F4/80 immunohistochemistry was run in the aortic roots of 52-week-old BATIRKO and control mice showed a greater macrophage infiltration in the aortic roots from 52 week-old BATIRKO mice in comparison to the control group (Figure 5.25.B).

ROS production and oxidative stress might be one of mechanisms involved in the vascular dysfunction observed in the 52-week-old BATIRKO mice. With the aim of studying it, an immunohistochemistry was carried out to evaluate the production of nitrotyrosine residues in the aortic roots, which was quantified and expressed regarding the tissue area (Figure 5.26.C). Likewise, the production of superoxide anion levels was detected in situ by the dihydroethidium (DHE) (Figure 5.26.D). It was observed that nitrotyrosine and superoxide anion levels were significantly higher in the aortic roots from 52-week-old BATIRKO mice compared to the controls.

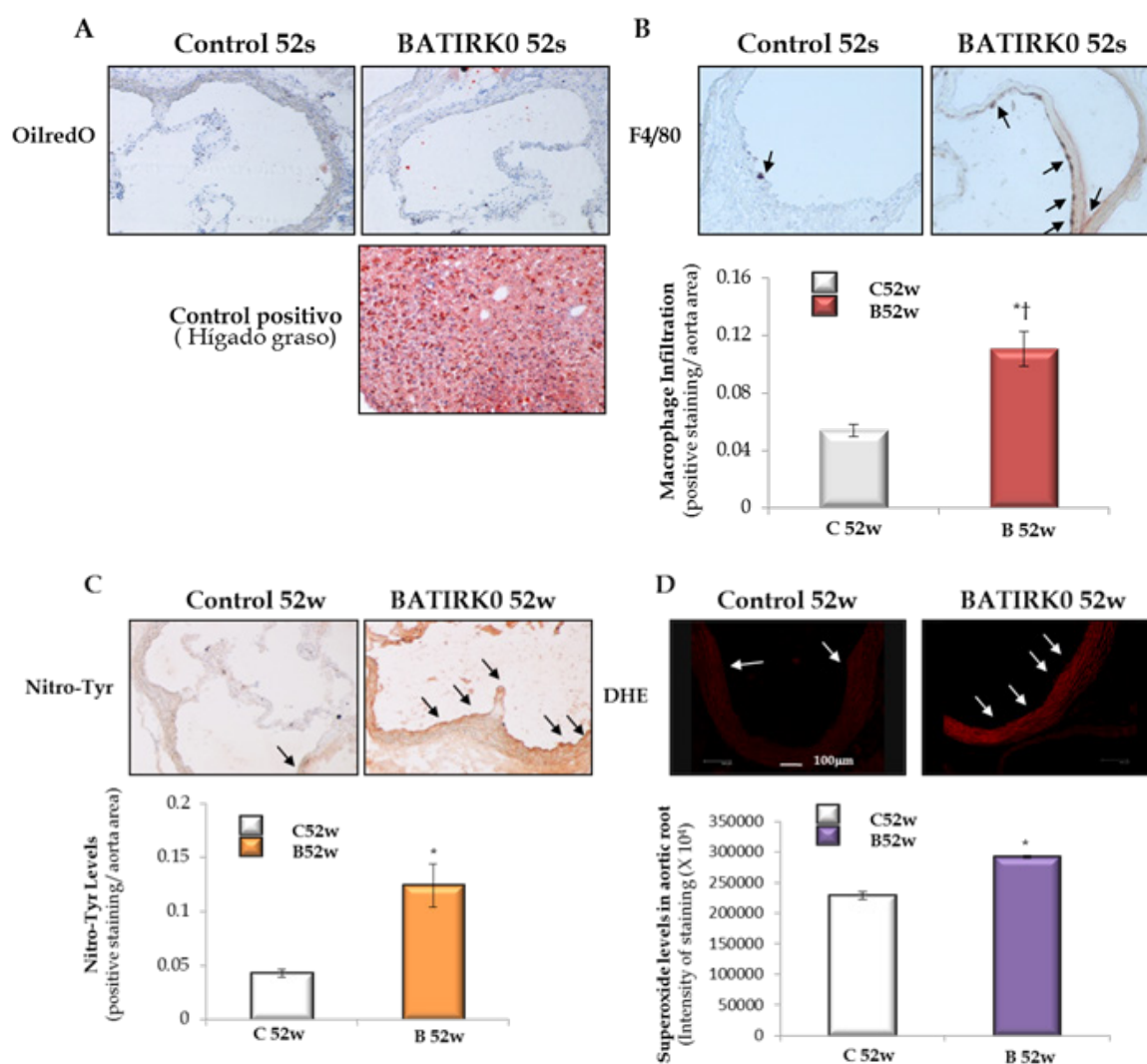


Figura 5.26. Caracterización del modelo BATIRKO de 52 semanas. Estudio de la inflamación en los arcos aórticos de ratones control y BATIRKO de 52 semanas. A. Tinción de Oil-Red para la detección de depósitos de lípidos en los arco aórticos. B. IHQ de F4/80, que mide la infiltración de macrófagos en el arco aórtico y cuantificación de la IHQ expresada como tinción positiva por área de aorta. C. IHQ de nitro-tirosina y cuantificación de los niveles de nitro-tirosina respecto al área del tejido. D. Detección in situ del anión superóxido por dihidroxietidina (DHE) en el arco aórtico y cuantificación del anión superóxido. * $p < 0.05$ vs. Control de 52 semanas.

Figure 5.26. Characterization of 52-week-old BATIRKO mice. Study of inflammation in the aortic roots of control and BATIRKO at 52 weeks of age. A. Oil-Red staining for detection of lipid depots in the aortic roots. B. IHC for F4/80, measuring macrophage infiltration in the aortic roots and IHC quantification are expressed as positive staining per aorta area. C. IHC for nitro-tyrosine and quantifying the levels of nitro-tyrosine relative to the tissue area. D. Detection of superoxide anion in situ by dihydroxyetidine (DHE) in the aortic roots and quantitation of superoxide anion. * $p < 0.05$ vs. 52-week-old Control mice.

Para evaluar si las citoquinas proinflamatorias podrían estar involucradas en los mecanismos responsables de la inflamación y la disfunción vascular, se analizó la actividad de unión de NF- α B en BAT y WAT en los tres grupos estudiados (Figura 5.27.A). Se encontró que el tratamiento con anti-TNF- α disminuyó signi-

In order to evaluate whether proinflammatory cytokines may be involved in the mechanisms responsible for inflammation and vascular dysfunction, it was analysed NF- α B binding activity in BAT and WAT in the three test groups (Figure 5.27.A). It was found that treatment with anti-TNF- α significantly decreased NF-

ficativamente la actividad de unión de NF- α B en BAT y WAT en comparación con el grupo BATIRKO de 52 semanas sin tratar.

Mediante qRT-PCR cuantitativa, se estudió la expresión de distintos genes implicados en el daño vascular en la arteria aorta. Se observó que los animales BATIRKO de 52 semanas presentaban un aumento significativo de genes relacionados con la activación endotelial como ET-1, y una molécula de adhesión como ICAM-1. Este grupo de animales también presentó un aumento significativo de la expresión de marcadores de inflamación como MCP-1, PAI-1 e iNOS respecto al grupo control. Sin embargo, el tratamiento con anti-TNF- α en los animales BATIRKO de 52 semanas redujo significativamente los niveles del mensajero para los marcadores de activación endotelial e inflamación (Figura 5.27.B).

α B binding activity in BAT and WAT when compared to 52-week-old BATIRKO mice without treatment.

Through quantitative qRT-PCR, the expression of various genes involved in the vascular damage in the aorta was studied. It was observed that 52-week-old BATIRKO mice showed a significant increase of genes expression related to endothelial activation, such as ET-1 and adhesion molecule as ICAM-1. This group also presented a higher increase of expression of inflammatory markers such as MCP-1, PAI-1 and iNOS in comparison to the control group. However, anti-TNF- α treatment reduced significantly the messenger level of the endothelial activation and inflammation markers in aorta from 52-week-old BATIRKO mice (Figure 5.27.B).

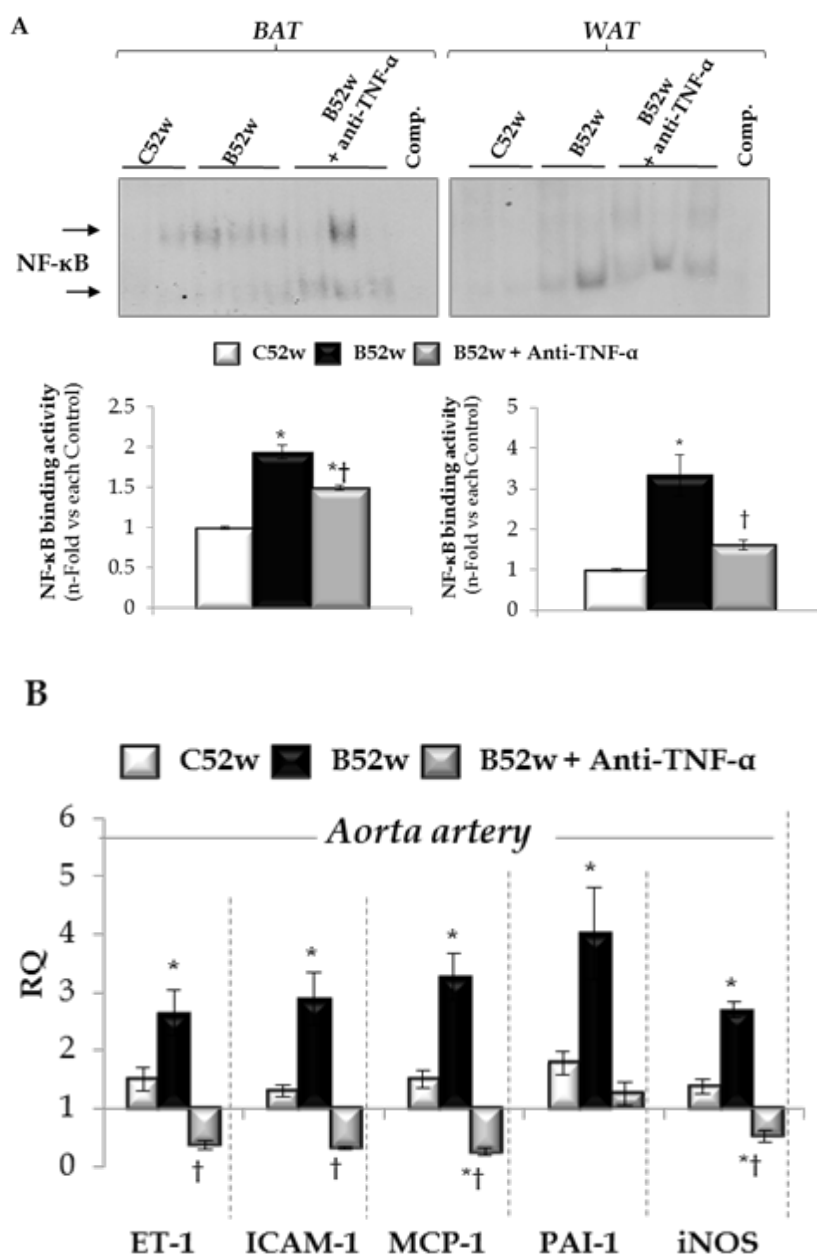


Figura 5.27. Efecto del tratamiento anti-TNF- α sobre la actividad inflamatoria de los grupos BATIRKO y control de 52 semanas. **A.** Geles representativos y cuantificación de la activación de NF- κ B tanto en BAT como en WAT de animales control de 52 semanas (C52w) y BATIRKO de 52 semanas con y sin tratamiento anti-TNF- α , (B52w) y (B52w+Anti-TNF- α), respectivamente. **B.** Análisis de la expresión del mRNA de ET-1, ICAM-1, MCP-1, PAI-1, e iNOS mediante qRT-PCR en la arteria aorta de ratones control y BATIRKO de 52 semanas. * $p < 0.05$ vs. Control de 52 semanas (C52w); † $p < 0.05$ vs. BATIRKO de 52 semanas (B52w).

Figure 5.27. Anti-TNF- α treatment effect on inflammatory activity in control and BATIRKO mice at 52 weeks of age. **A.** Representative gels and quantification of NF- κ B protein expression in both BAT and WAT from 52-week-old Control mice (C52w) and 52-week-old BATIRKO mice without or with anti-TNF- α treatment (B52w) and (B52w+Anti-TNF- α), respectively. **B.** Analysis of ET-1, ICAM-1, MCP-1, PAI-1, and iNOS mRNA expression by qRT-PCR in the aorta from three groups. * $p < 0.05$ vs. 52-week-old Control mice (C52w); † $p < 0.05$ vs. 52-week-old BATIRKO mice (B52w).

Por otra parte, se analizó la señalización de insulina en BAT, WAT (depósitos viscerales:

On the other hand, insulin signalling was analysed in BAT, WAT (visceral depots: gonadal and retroperitoneal) and in the aorta (Fi-

gonadal y retroperitoneal) y en la arteria aorta (Figura 5.28). Se observó que el animal BATIRKO de 52 semanas presentó un fallo de la señalización de la insulina en los tres tejidos estudiados comparado con el control de 52 semanas.

En primer lugar, el ratón BATIRKO de 52 semanas al tener una delección del IR específicamente en el BAT, presentaba resistencia primaria a la insulina en este tejido. Sin embargo, el fallo observado en la señalización de la insulina en WAT del animal BATIRKO de 52 semanas, fue corregida por el tratamiento con anti-TNF- α . Además, el tratamiento con anti-TNF- α también normalizó la señalización de la insulina vascular (Figura 5.28).

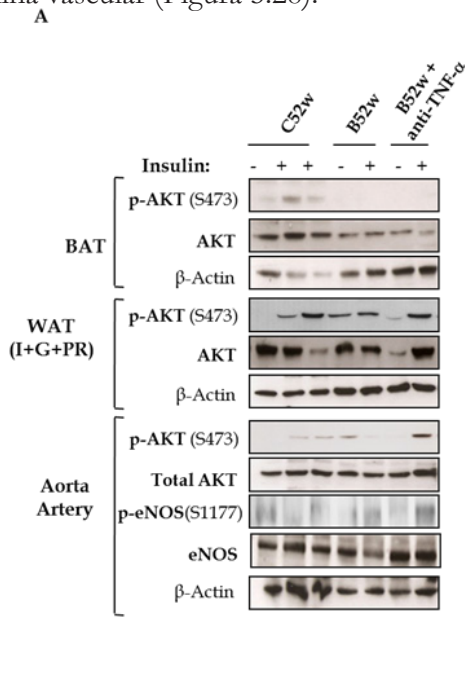


Figura 5.28. Efecto del tratamiento anti-TNF- α en la señalización in vivo de la insulina en los tejidos adiposos y la aorta de BATIRKO de 52 semanas. **A.** Geles representativos de la señalización de insulina. Se ha determinado por Western blot la fosforilación de AKT (Ser473) en BAT, WAT y arteria aorta de animales control de 52 semanas (C52w) y BATIRKO de 52 semanas con y sin tratamiento con anti-TNF- α . En la aorta también se midió la fosforilación de eNOS (S1177), ya que su disminución de la fosforilación está implicada directamente en la disfunción endotelial. **B.** Cuantificación de la señalización in vivo de la insulina en BAT, WAT y arteria aorta de animales control de 52 semanas (C52w) y BATIRKO de 52 semanas con y sin tratamiento con anti-TNF- α .

figure 28). It was observed, unlike the controls, 52-week-old BATIRKO mice showed insulin signalling failure in the three studied tissues (Figure 5.28).

At first, 52-week-old BATIRKO mice having suffered IR deletion specifically in BAT, showed primary insulin resistance in this tissue. However, the insulin signalling failure observed in the WAT of 52-week-old BATIRKO mice changed with an anti-TNF- α treatment. Moreover, the anti-TNF- α treatment also normalized the vascular insulin signalling (Figure 5.28).

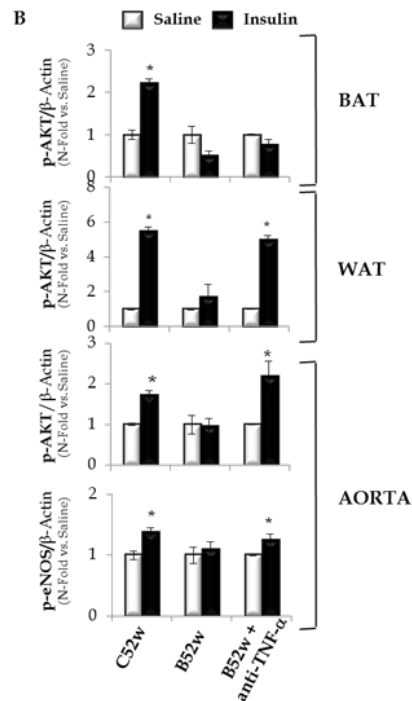


Figure 5.28. Effect of anti-TNF- α treatment in vivo insulin signalling in adipose tissues and aorta from 52-week-old BATIRKO mice. **A.** Representative gels of insulin signalling. We have determined by Western blot analysis AKT (Ser473) phosphorylation in BAT, WAT, and aorta from 52-week-old Control mice (C52w) and 52-week-old BATIRKO with or without anti-TNF- α treatment. In the aorta, we have also studied eNOS (S1177) phosphorylation due to the reduction of its phosphorylation is involved directly in endothelial dysfunction. **B.** Quantification of in vivo insulin signalling in BAT, WAT, and aorta artery from 52-week-old Control mice (C52w) and 52-week-old BATIRKO mice with or without anti-TNF- α treatment.

5.1.5.3. Expresión y asociación del IRA con el TNF-R1 en la arteria aorta de ambos modelos experimentales

Para realizar una aproximación molecular in vivo de la progresión del daño vascular se utilizaron dos modelos animales. El modelo animal ApoE^{-/-} de 24 semanas se utilizó como modelo de aterosclerosis y el modelo BATIRKO de 52 semanas como un modelo murino de resistencia a la insulina y disfunción vascular. Ambos modelos animales presentaron un aumento significativo de la expresión del mRNA para los genes que codifican ET-1, ICAM-1, MCP-1, PAI-1 y TNF- α en la arteria aorta.

Por estas características presentes en ambos modelos, fue realmente importante establecer si existía alguna relación entre los niveles de las dos isoformas del receptor de insulina y los niveles de TNF-R1 y si podrían estar relacionados con la aparición temprana del daño vascular. Así, se determinaron los niveles de expresión del mRNA de las dos isoformas del IR y TNF-R1, en la aorta de ambos modelos animales por qRT-PCR (Figura 5.29).

En primer lugar, se cuantificó la expresión del mRNA en el modelo ApoE^{-/-}. No se observaron cambios significativos de la expresión de la isoforma IRB en la arteria aorta. Sin embargo, se produjo un aumento significativo de la expresión de la IRA y el TNF-R1 (Figura 5.29.A). En segundo lugar, en el modelo BATIRKO de 52 semanas, también se observó un aumento significativo de la expresión de IRA y TNF-R1. Sin embargo, en BATIRKO de 52 semanas, el aumento tanto de IRA como en TNF-R1 se redujo significativamente con el tratamiento con anti-TNF- α (Figura 5.29.B).

5.1.5.3 IRA expression and its association with TNF-R1 in the aortas from both experimental models

In order to realize an approximation of the vascular damage molecular expression in vivo, two animal models were used. 24-week-old ApoE^{-/-} mice was used as a model of atherosclerosis and 52-week-old BATIRKO as a murine model of insulin resistance and vascular dysfunction. Both animal models showed a significant increase of genes mRNA expression, such as: ET-1, ICAM-1, MCP-1, PAI-1 and TNF- α in the aorta artery.

By these characteristics found in both models, it was really important to establish if there was a relationship between the insulin receptor isoforms levels and TNF-R1 level, and if they could be related to an early vascular damage appearance. For this reason, mRNA expression levels in IR isoforms and TNF-R1 was determined in aortas from both animal models by qRT-PCR (Figure 5.29).

Firstly, mRNA expression in the ApoE^{-/-} model was quantified. No significant change of the IRB isoform expression in the aorta was observed. However, a significant increase of IRA and TNF-R1 was showed (Figure 5.29.A). Secondly, a significant increase of IRA and TNF-R1 was observed as well in 52-week-old BATIRKO model. However, in the 52-week-old BATIRKO mice, this increase in IRA as well as in TNF-R1 was reduced significantly with an anti-TNF- α treatment (Figure 5.29.B).

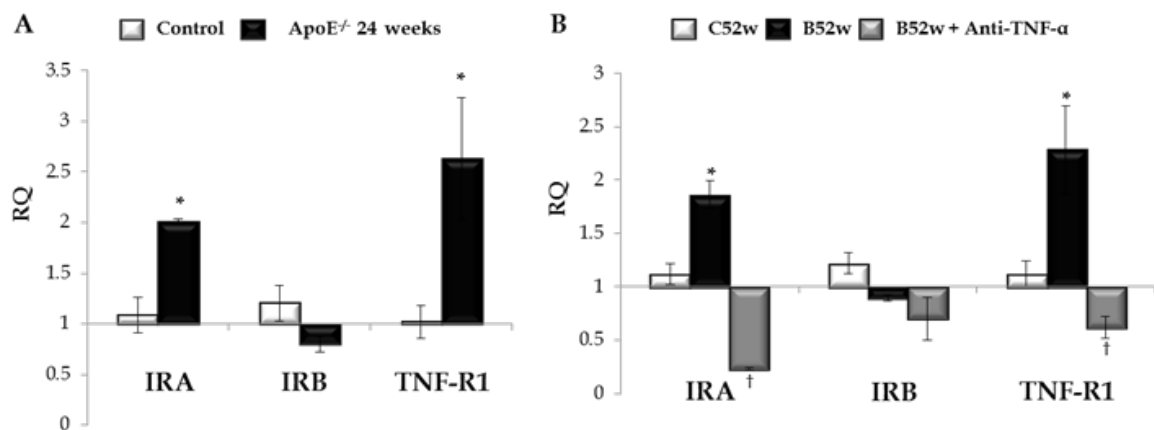


Figura 5.29. Análisis de la expresión del IRA, IRB y TNF-R1 en la aorta de animales ApoE^{-/-} y BATIRKO por qRT-PCR. Expresión del mRNA de IRA, IRB y TNF-R1 en la aorta de animales ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad (A), BATIRKO de 52 semanas y BATIRKO tratado con anti-TNF-α (B).

Figure 5.29. Expression analysis of IRA, IRB and TNF-R1 in the aorta from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice by qRT-PCR. mRNA expression of IRA, IRB and TNF-R1 in the aorta from 24-week-old ApoE^{-/-} mice (A), 52-week-old BATIRKO mice and 52-week-old BATIRKO mice treated with anti-TNF-α (B).

Aunque, los modelos ApoE^{-/-} de 24 semanas y BATIRKO de 52 semanas presentaban diferencias en su perfil metabólico, ambos modelos animales presentaron un aumento significativo de la expresión del mRNA de la isoforma IRA y de los marcadores de daño vascular en aorta. Por ello, se decidió realizar el análisis de coeficiente de correlación entre la isoforma IRA y los marcadores de daño vascular (Figura 5.30). Se observó una correlación significativa entre la expresión de la IRA y cada uno de los marcadores de daño vascular estudiado en ambos modelos experimentales.

Although, 24-week-old ApoE^{-/-} and 52-week-old BATIRKO models presented differences in their metabolic profiles, both animal models showed an increase of IRA mRNA expression and vascular damage markers in the aorta. For this reason, it was decided to perform an analysis of the correlation coefficient between IRA and the vascular damage markers (Figure 5.30). In both experimental models, a significant correlation was observed between IRA expression and each one of the vascular damage markers studied.

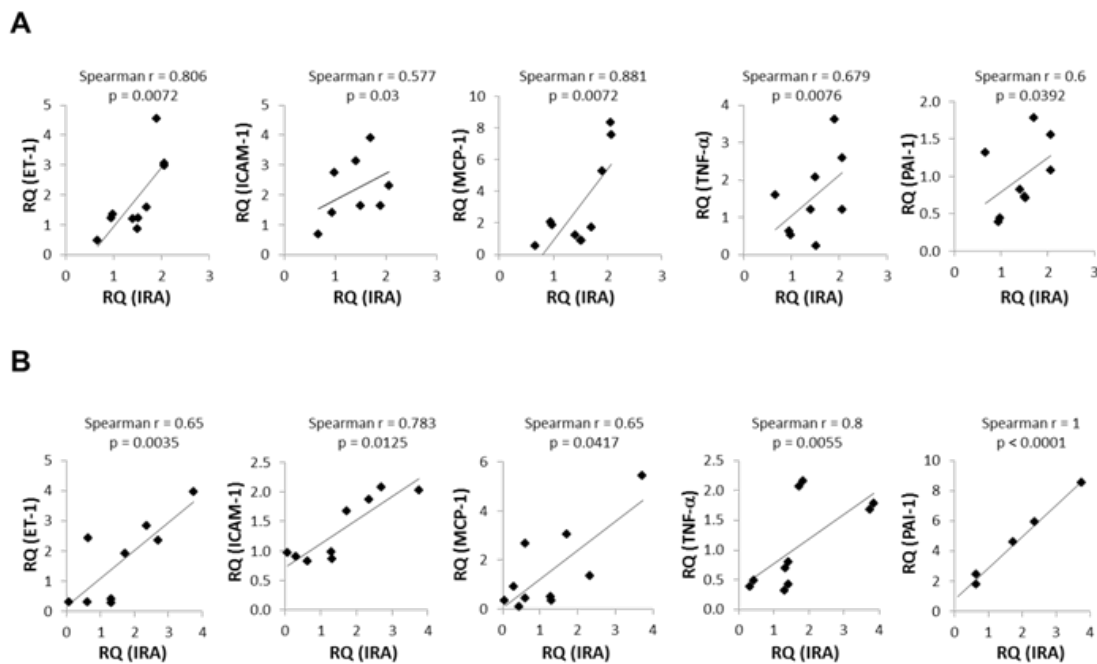


Figura 5.30. Papel de la isoforma IRA en el daño vascular. Se utilizó el análisis de coeficiente de correlación de Spearman para evaluar las asociaciones entre la expresión del mRNA de IRA con ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α y PAI-1 en la arteria aorta del modelo ApoE^{-/-} de 24 semanas (A) y del modelo BATIRKO de 52 semanas (B).

Figure 5.30. IRA isoform role in vascular damage. Spearman's correlation coefficient analysis was used to assess associations between mRNA expression of IRA with ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α and PAI-1 in the aorta artery from 24-week-old ApoE^{-/-} model (A) and 52-week-old BATIRKO mice (B).

Puesto que los resultados anteriores mostraron un aumento de la expresión del mRNA tanto de la isoforma IRA como TNF-1R, y que esto sugería una posible relación entre ambos receptores como habíamos visto in vitro y que además su asociación podría estar favorecida por la presencia de TNF- α como ocurre en la aorta de ambos modelos. Estos resultados sugieren que podría existir una asociación entre la isoforma IRA y TNF-R1, que se podría involucrar en la resistencia a la insulina y una progresión del daño vascular en ambos modelos animales.

As the previous results revealed an increase in IRA mRNA expression as in TNF-R1, suggesting a possible relationship between the two receptors as observed in vitro, and that, on top of that, this association may be facilitated by TNF- α presence, as it happens in the aorta of both models. These results might suggest an association between IRA and TNF-R1, and may be involved in insulin resistance and vascular damage progression in both animal models.

En primer lugar, se realizaron inmunoprecipitaciones dobles con el anticuerpo IRB en los extractos proteicos de arcos aórticos de animales ApoE^{-/-} de 24 semanas y BATIRKO de 52 semanas y sus respectivos controles (Figura 5.31). El anticuerpo IRB reconoce exclusivamente la isoforma IRB (previamente descrito en la caracterización de las líneas celulares

At first, double immunoprecipitations of protein extracts from the aortas of 24-week-old ApoE^{-/-} mice and 52-week-old BATIRKO mice and their respective control groups were carried out with IRB antibody (Figure 5.31). IRB antibody exclusively recognizes IRB isoform previously described in the cell lines characterization (Part section 5.1.1). Afterwards, supernatants originating from the second precipitation were immunoprecipitated with IR β antibody (antibody that recognizes IRA as well

(apartado 5.1.1). Posteriormente, los sobrenadantes procedentes de la segunda precipitación fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo IR β (anticuerpo que reconoce tanto la isoforma IRA como IRB). Finalmente, los complejos inmunes (los cuales solo contenían IRA) fueron separados en geles de SDS-PAGE e inmunotransferidos a membranas. Se realizó el Western blot frente al anticuerpo anti-TNF-R1 e IR β para determinar la asociación entre la isoforma IRA y TNF-R1.

Se confirmó que no solo existían niveles aumentados de la expresión IRA y TNF-R1, sino que existía una significativa asociación proteica entre los dos receptores en la aorta tanto en los animales ApoE $^{-/-}$ de 24 semanas como BATIRKO de 52 semanas, comparados con sus respectivos controles (Figura 5.31.A y B, respectivamente). Aún más importante, el tratamiento con anti-TNF- α redujo significativamente la asociación entre el TNF-R1 y la isoforma A del receptor de la insulina en el ratón BATIRKO de 52 semanas (Figura 5.31.B).

as IRB isoform). Eventually, the immune complexes (which only contained IRA) were separated in SDS-PAGE gels and immunotransferred to membranes. A Western blot against anti-TNF-R1 antibody and IR β was run to assess the association between IRA isoform and TNF-R1.

It confirmed that not only existed increased levels of IRA and TNF-R1 expression, but as well a significant protein association existed between the two receptors, in the aorta of 24-week-old ApoE $^{-/-}$ mice and 52-week-old BATIRKO mice in comparison to their respective controls (Figure 5.31.A and B, respectively). In addition, anti-TNF- α treatment reduced significantly the association between TNF-R1 and IRA in 52-week-old BATIRKO mice (Figure 5.31.B).

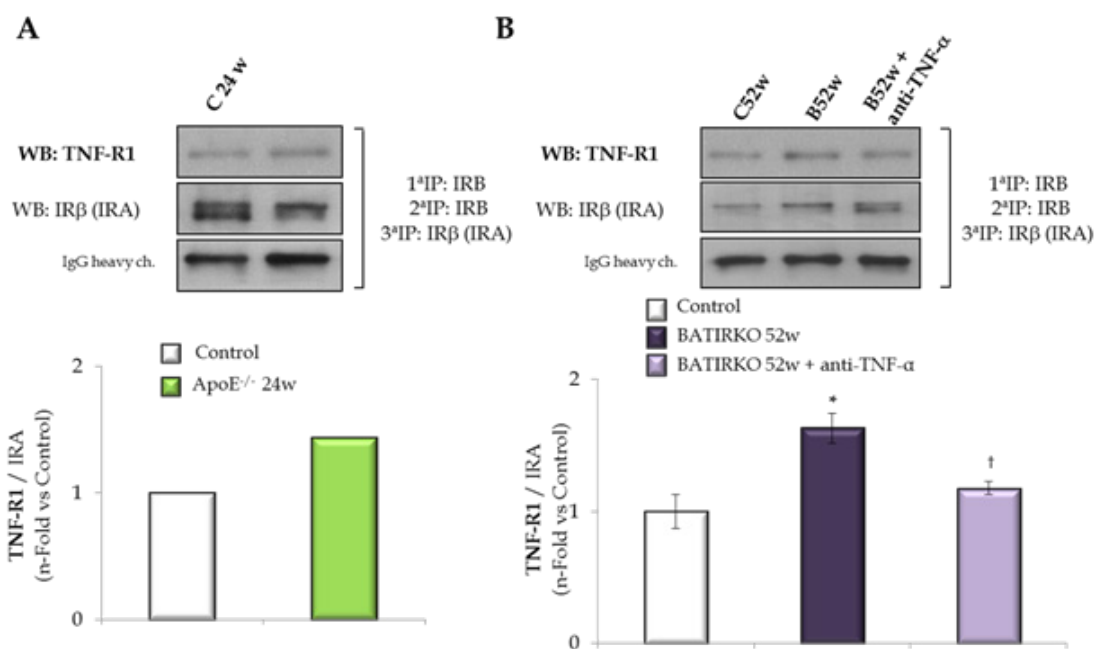


Figura 5.31. Geles representativos y cuantificación de la asociación de TNF-R1 con IRA en la aorta de ambos modelos experimentales. 150 gramos de proteína fueron inmunoprecipitados dos veces con IRB y una única inmunoprecipitación con IRβ. Análisis por Western blot de la expresión proteica de TNF-1R y IRβ. A. En el modelo ApoE^{-/-} y controles de 24 semanas fueron usados conjuntos de aortas puesto que no se obtuvo suficiente cantidad al obtenerlos de forma individual. B. En el modelo BATIRKO de 52 semanas, se utilizaron 3 animales por grupo. * $p < 0.05$ vs. Control de 52 semanas; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO de 52 semanas. Abreviaturas: IP, inmunoprecipitación; WB, Western blot.

Figure 5.31. Representative gels and quantification of TNF-R1 association with IRA in aorta. 150 grams of protein were immunoprecipitated with IRB twice and a single time immunoprecipitation with IRβ. There were analysed protein expressions of TNF-1R and IRβ by Western blot. A. In ApoE^{-/-} mice and control mice at 24 weeks of age were used pools of aorta since it is not got enough to get them individually. B. In the 52-week-old BATIRKO model, 3 animals per group were used. * $p < 0.05$ vs. 52-week-old Control mice; † $p < 0.05$ vs. 52-week-old BATIRKO. Abbreviation: IP, immunoprecipitation; WB, Western blot.

5.1.6. Papel del IGF-2 y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en el inicio y desarrollo del proceso aterosclerótico

Se ha descrito que IGF-2 está implicado en el crecimiento de la placa aterosclerótica y muestra 10 veces más afinidad por el IRA que por IRB (Zaina 2002). Por estos motivos se estudió el papel del IGF-2 en la proliferación de las células de músculo liso vascular y su contribución al desarrollo del proceso aterosclerótico.

5.1.6 Role of IGF-2 and IRA/IGF-1R hybrid receptors in the beginning and development of the atherosclerosis process.

It has been described that IGF-2 is involved in atherosclerosis plaque development and shows 10-fold more affinity for IR than IRB (Zaina et al. 2002). For this reason, IGF-2 role in vascular smooth muscle cells proliferation and its contribution to the atherosclerosis process was studied.

En primer lugar, las células IRloxP+/+ fueron estimuladas con IGF-1 o IGF-2 (10nM cada uno) y se realizó la cuantificación de la expresión del mRNA tanto para IRA como IRB inducida por ellos con respecto al control (expresión basal) (Figura 5.32.A). Se observó que IGF-2 indujo un incremento significativo de la expresión del mRNA para la isoforma IRA, pero no para la isoforma IRB.

Posteriormente, se analizó la expresión del receptor para IGF-1 (IGF-1R) inducido por diferentes estímulos como insulina (10-100 nM), TNF- α , Ang II, ET-1, U46619, IGF-1 e IGF-2 (Figura 5.32.B). Se observó que sólo el IGF-2 aumentó significativamente los niveles de expresión de IGF-1R. Sin embargo, no hay efecto en respuesta al IGF-1 (Figura 5.32.A y B). La expresión del IGF-1R se analizó puesto que éste sirve de receptor tanto para IGF-1 como IGF-2. IGF-2 también puede unirse al receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes), que actúa como un antagonista de su señalización.

Por otra parte, se analizó los niveles de IGF-2 secretados por las VSMCs inducidos por insulina (10-100 nM), TNF- α , Ang II, ET-1 y U46619. Se encontró que la insulina y el TNF- α aumentaron de manera significativa la secreción de IGF-2 en el sobrenadante de las células. Esto fue determinado mediante un ELISA (Figura 5.32.B).

First of all, IRloxP+/+ cells were stimulated with IGF-1 or IGF-2 (10 nM each). It was assessed the mRNA expression quantification of IRA and IRB induced by IGFs as compared to the controls (Figure 5.31.A). It was observed that IGF-2 induced a significant increase IRA mRNA expression but not for insulin receptor B isoform.

Subsequently, receptor expression for IGF-1 (IGF-1R) induced by various stimuli such as insulin (10-100 nM), TNF- α , Ang II, ET-1, U46619, IGF-1 and IGF-2 were tested (Figure 5.32.B). It was observed that only IGF-2 significantly increased IGF-1R expression levels. On the opposite, there is no effect in response to IGF-1 (Figure 5.32.A and B). IGF-1R expression was analysed as it serves as a receptor for IGF-1 and IGF-2. IGF-2 also can bind to the IGF-2 receptor (known as well as cation-independent mannose 6 phosphate receptor), which acts as a signalling antagonist.

On the other hand, IGF-2 secretion by VSMCs induced by insulin (10-100 nM), TNF- α , Ang II, ET-1 and U46619 were analysed. It was found that insulin and TNF- α were significantly increased IGF-2 secretion in VSMCs cell supernatant. This was determined by ELISA (Figure 5.32.B).

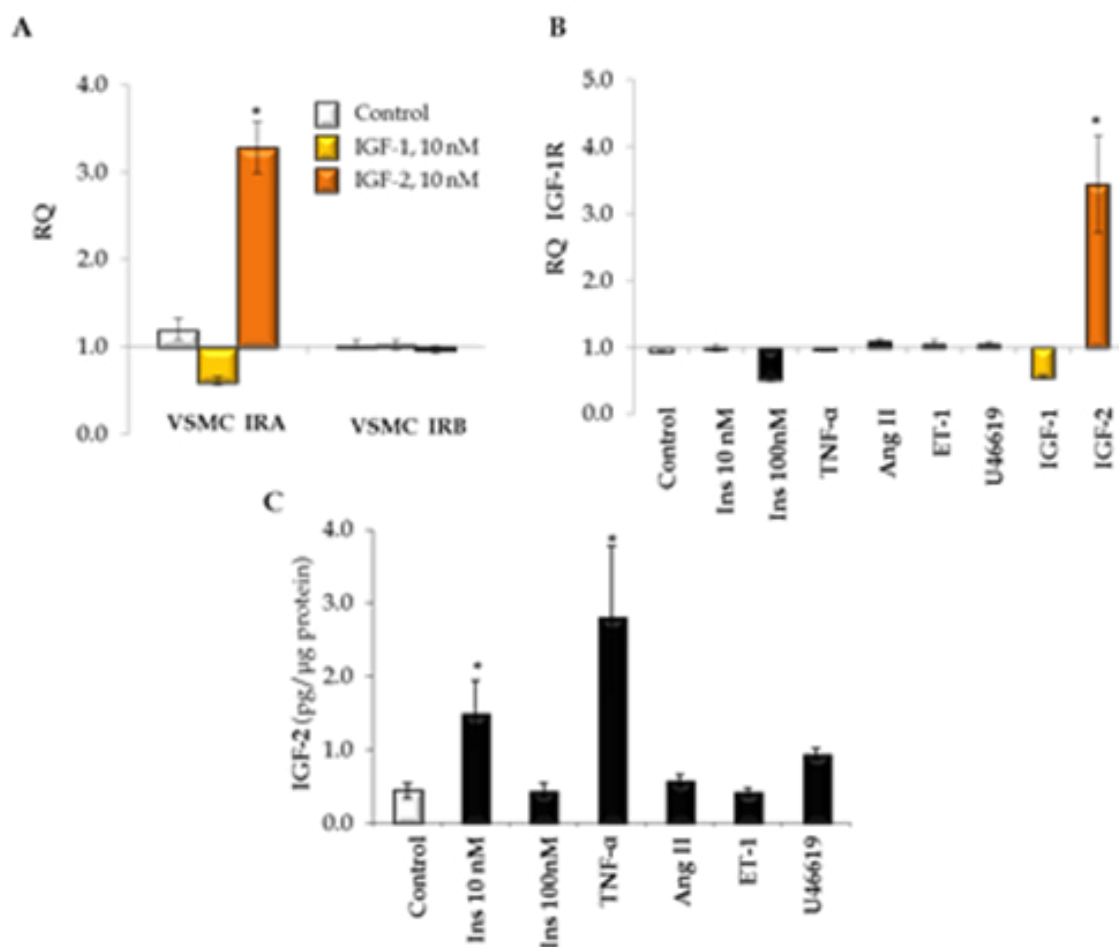


Figura 5.32. Papel de IGF-2 en la expresión de las isoformas del IR e IGF-1R en VSMCs. A. Análisis por qRT-PCR de la expresión del mRNA de IRA e IRB inducida por IGF-1 e IGF-2 durante 24 horas en IRloxP+/+ VSMCs. B. Análisis por qRT-PCR de IGF-1R inducida por insulina, TNF- α , Ang II, ET-1, U46619, IGF-1 e IGF-2 en IRloxP+/+ VSMCs durante 24 horas. C. Producción de IGF-2 inducida por la insulina y estímulos proaterogénicos en el sobrenadante de IRloxP+/+ VSMCs durante 24 horas. Los niveles de IGF-2 fueron determinados mediante un kit de ELISA comercial de IGF-2. * $p < 0.05$ vs. control.

Figure 5.32. IGF-2 role in the expression of IR isoforms and IGF-1R in VSMCs. A. By qRT-PCR, we have analyzed IRA and IRB mRNA expression in IRloxP+/+ VSMCs stimulated by IGF-1 and IGF-2 for 24 hours. B. Analysis by qRT-PCR of IGF-1R mRNA expression in IRloxP+/+ VSMCs stimulated by TNF- α , Ang II, ET-1, U46619, IGF-1 and IGF-2 for 24 hours. C. Production of IGF-2 in the supernatant of IRloxP+/+ VSMCs stimulated by insulin or pro-atherogenic molecules for 24 hours. The IGF-2 levels were determined using commercial ELISA kit of IGF-2. * $p < 0.05$ vs. control.

Para estudiar el efecto de la insulina, TNF- α e IGF-2 en los niveles de proteína de las isoformas del receptor de la insulina y el IGF-1R en las VSMCs, se estimuló las células IR-LoxP+/+ con insulina (100 nM), TNF- α (10 ng/ml) e IGF-2 (25 nM) y se analizó los niveles de expresión proteica de la isoformas del IR, IR β (total) e IGF-1R (Figura 5.33).

In order to study insulin, TNF- α and IGF-2 effect in the protein levels of IR isoforms and the IGF-1R in VSMCs, IRLoxP+/+ cells were stimulated with insulin (100 nM), TNF- α (10 ng/ml) and IGF-2 (25 nM) and IR isoforms, IR β (total) and IGF-1R protein expression levels were analysed (Figure 5.33).

Se realizó una primera inmunoprecipitación con 150 g de proteína con el anticuerpo anti-IRB, posteriormente el Western blot frente IRB y así obtener los inmucomplejos que contenían IRB (Figura 5.33A). Los sobrenadantes de esta primera inmunoprecipitación (que ya no contenían la isoforma IRB) se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-IR β , el cual reconoce ambas isoformas del IR, de este modo estos complejos inmunes contenían únicamente la isoforma IRA. Se analizó por Western blot con el anticuerpo anti-IR β y en este caso la banda corresponde únicamente a la isoforma IRA (Figura 5.33.B). Para detectar los niveles de proteína del IR total y del IGF-1R, se siguió el mismo esquema de estimulación mencionado anteriormente. Se realizó una inmunotransferencia de 50g de los lisados proteicos incubándose con los anticuerpos anti-IR β o anti-IGF-1R (Figura 5.33.C y D). De este modo, confirmamos que la insulina a 100nM indujo un aumento del receptor de la insulina, siendo mayoritariamente este aumento debido al de IRA (Figura 5.33.A, B y C). Y además, la insulina a 100nM no modificó la expresión de IGF-1R (Figura 5.33.D). Sin embargo, el TNF- α e IGF-2 indujeron un aumento de la expresión tanto de IGF-1R como de IRtotal (Figura 5.33.C y D). El aumento de IRtotal inducido por ambas señales se debía únicamente al inducido en IRA (Figura 5.33.B) debido a que tanto el TNF- α como IGF-2 reducen la expresión de IRB con respecto a su situación basal (Figura 5.33.A).

A first immunoprecipitation of 150 mg of protein by anti-IRB antibody was carried out; then a Western blot against IRB and obtaining the immunocomplexes that IRB contained (Figure 5.33.A). Supernatants from this first immunoprecipitation (which already did not contain isoform B) were immunoprecipitated by anti-IR β antibody, which recognises both IR isoforms. In this way, these immunocomplexes only contained IRA isoform. Through Western blot against anti-IR β antibody and, in this case, the band only corresponds to IRA isoform (Figure 5.33.B). To detect protein levels of total IR and IGF-1R, the previously described stimulation process was followed. An immunomembrane of 50 mg of total protein extracts incubated with anti-IR β or anti-IGF-1R antibody was carried out (Figure 5.33.C and D). Then, it was confirmed that insulin (100 nM) induce an increase in insulin receptor, mainly due to IRA increase (Figure 33.A, B y C). On top of that, a 100 nM insulin dose did no change IGF-1R expression (Figure 5.33.D). However, TNF- α e IGF-2 induced IGF-1R as well as IR total expression increase (Figure 45.33.C and D). IRtotal increase induced by both signal, was only due to the one induced in IRA (Figure 5.32.B) caused by the fact that TNF- α as well as IGF-2 reduced IRB expression with regard to its basal expression (Figure 5.33.A).

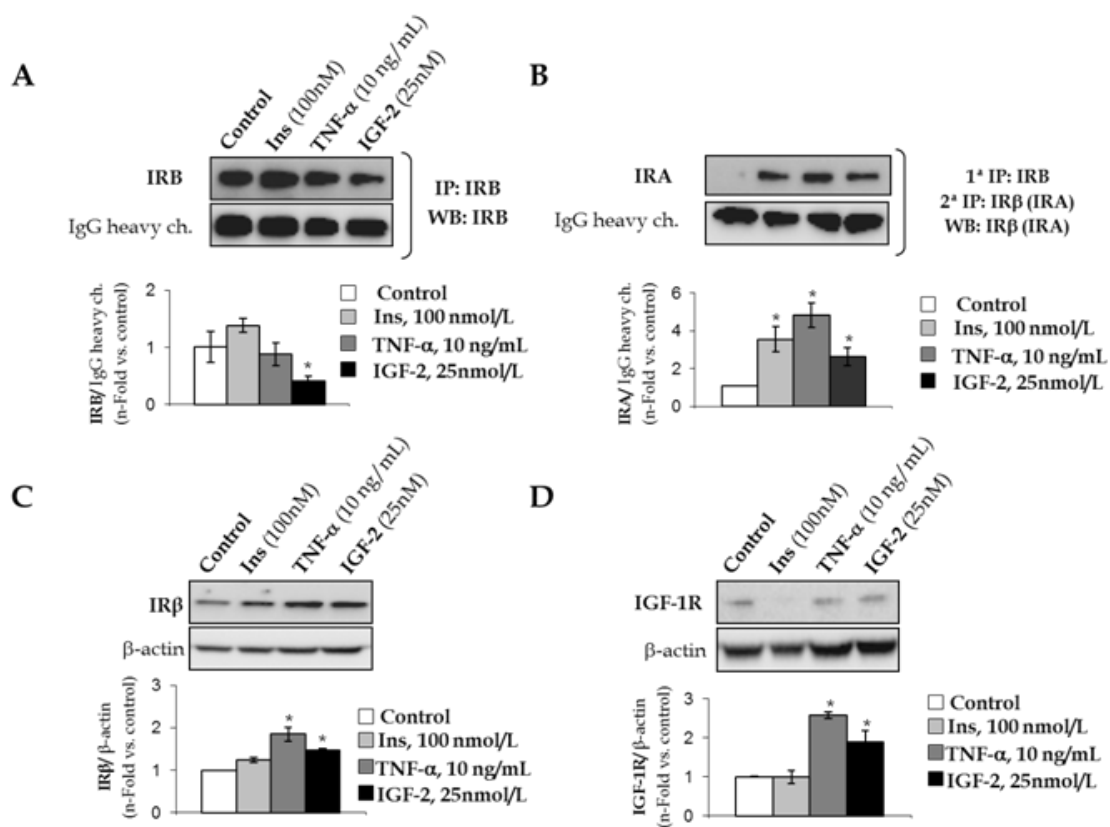


Figura 5.33. Efecto de la insulina, TNF- α e IGF-2 en los niveles de proteína del receptor de la insulina y del IGF-1R. Experimentos realizados en las IRloxP+/+ VSMCs. Niveles proteicos de la isoforma IRB (A), de la isoforma IRA (B), del IR total (C) y del IGF-1R (D). Inmunoprecipitación (IP) y Western blot (WB). * $p < 0.05$ vs. control.

Figure 5.33. Effect of insulin, TNF- α and IGF-2 in the protein expression levels of the insulin receptor and the IGF-1R. Experiments in cells IRloxP+/+ VSMCs. Protein levels of IRB isoform (A), IRA isoform (B), total IR (C) and IGF-1R (D). Immunoprecipitation (IP) and Western blot (WB). * $p < 0.05$ vs. control.

Para analizar el efecto de los IGFs sobre la proliferación celular en las células de músculo liso vascular, se realizaron experimentos de incorporación de BrdU y de conteo celular. Inicialmente, todas las líneas celulares fueron estimuladas con IGF-1 e IGF-2. Se utilizaron concentraciones de 10nM y 25nM de ambos estímulos (Figura 5.34). Se observó que el IGF-1 aumentó significativamente la proliferación de todas las líneas celulares estudiadas, a ambas dosis, pero especialmente a 25nM (Figura 5.34.A). Sin embargo, sólo se observó un aumento significativo de la proliferación con IGF-2 a 25nM en las líneas celulares IR-/- e IRA VSMCs (Figura 5.34.B). Estos hallazgos con IGF-2 fueron confirmados por conteo celular. Se observó igualmente un aumento

In order to analyse IGFs effect on cell proliferation in the vascular smooth muscle cells, BrdU incorporation experiments and cells counting were carried out. Initially, all the cells lines were stimulated with IGF-1 and IGF-2 at 10 nM and 25 nM (Figure 5.34). It was observed that IGF-1 significantly increased proliferation of all the cells lines analysed, and with an especially large increase at 25 nM (Figure 5.34.A). Conversely, IGF-2 at 25 nM only induced a significant increase of proliferation in IR-/- and IRA VSMCs (Figure 5.34.B). These results obtained with IGF-2 were confirmed by cell counting. In addition, a significant increase of proliferation and cell viability induced by IGF-2 in IR-/- and IRA VSMCs (Figure 5.34.C). On the opposite, no signifi-

significativo de la proliferación y la viabilidad inducida por IGF-2 tanto en IR^{-/-} como en las IRA VSMCs (Figura 5.34.C). Sin embargo, ningún efecto significativo se observó en IRloxP^{+/+} e IRB VSMCs.

cant effect was observed in IRloxP^{+/+} and IRB VSMCs.

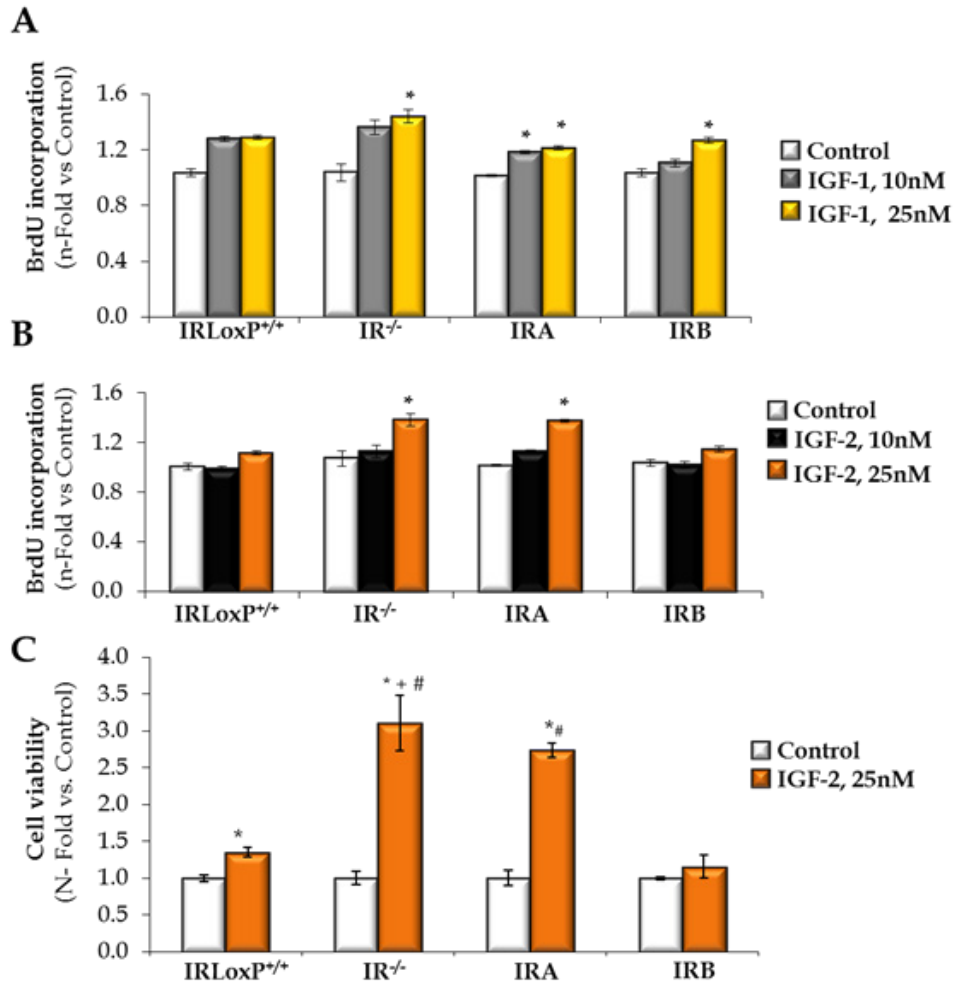


Figura 5.34. Papel de los IGFs en la proliferación de las VSMCs. A. Análisis de la proliferación inducida por IGF-1 a 10 o 25 nM por incorporación de BrdU. * $p < 0.05$ vs. control. B. Análisis de proliferación inducida por IGF-2 a 10 o 25 nM por incorporación de BrdU. * $p < 0.05$ vs. control. C. Experimentos de viabilidad celular inducida por IGF-2 a 25 nM en las diferentes líneas celulares de VSMCs. Estos experimentos fueron realizados en un contador celular CASY. * $p < 0.05$ vs. cada control; + $p < 0.05$ vs. IRloxP^{+/+}; # $p < 0.05$ vs. IR^{-/-}. Todos los experimentos se realizaron por lo menos 4 veces.

Figure 5.34. Role of IGFs in VSMCs proliferation. A. Analysis of proliferation induced by IGF-1 at 10 and 25 nM for BrdU incorporation. * $p < 0.05$ vs. control. B. Analysis of proliferation induced by IGF-2 at 10 and 25 nM for BrdU incorporation. * $p < 0.05$ vs. control. C. Experiments of cell viability induced by 25 nM IGF-2 in VSMCs in the CASY cell counter. * $p < 0.05$ vs. each control; + $p < 0.05$ vs. IRloxP^{+/+}; # $p < 0.05$ vs. IR^{-/-}. All experiments were performed at least 4 times.

Un paso más allá, para continuar en el estudio de las asociaciones entre los receptores IGFs y las isoformas del receptor de la insulina, las líneas celulares IRA e IRB VSMCs fueron estimuladas con IGF-1 e IGF-2 a 25nM (Figura 5.35). Se escogió la dosis de 25 mM, puesto

To further study the association between IGFs receptors and insulin receptors isoforms, IRA and IRB VSMCs lines were stimulated with IGF-1 and IGF-2 at 25nM (Figure 5.35). A 25nM dose was chosen as the maximum response was observed with this dose during the proliferation studies (Figure 5.34.).

que a ésta se encontró la máxima respuesta en los estudios de proliferación (Figura 5.35). Adicionalmente, IGF-2, a esta dosis, aumentó significativamente la expresión de la isoforma IRA en las células IRloxP+/+ (Figura 5.32.A and 5.33.B). Se estudió la asociación entre las isoformas del IR y el IGF-1R, para lo cual los lisados proteicos fueron inmunoprecipitados frente al receptor de la insulina (IR β) y se realizó un Western blot frente a IGF-1R (Figura 5.35). Igualmente, se estudió si la estimulación con el TNF- α (10 ng/ml) podría inducir la asociación con alguna de las isoformas del receptor de la insulina. Se observó que en ambas líneas celulares existe una asociación basal entre el IRA o IRB y el IGF-1R. Sin embargo, la formación de receptores híbridos IR-IGF-1R sólo se incrementó de forma significativa a las 42h de estimulación con IGF-2 o TNF- α en IRA VSMCs. Esta asociación no fue favorecida por IGF-1 en IRA VSMCs. Estos resultados son consistentes con el hecho de que el TNF- α o IGF-2 indujeran mayor proliferación en IRA VSMCs en comparación con IRB VSMCs (Figuras 5.13, 5.32, 5.33 y 5.34).

In addition, IGF-2, at this dose, significantly increased IRA expression in IRloxP+/+ cells (Figure 5.32.A). The association between IR isoforms and IGF-1R was studied by immunoprecipitation against insulin receptor (IR β) followed by a Western blot against IGF-1R (Figure 5.35). Moreover, it was studied whether stimulation with TNF- α (10ng/ml) might induce an association with any of the insulin receptor isoforms. It was observed that in both cells lines showed a basal association between IRA or IRB and IGF-1R. However, IR-IGF-1R hybrid receptors formation only increased significantly after 42 hours of stimulation with IGF-2 or TNF- α in IRA VSMCs. This association was not facilitated with IGF-1 stimulation in IRA VSMCs. This results are consistent with the fact that TNF- α or IGF-2 would induced greater proliferation in IRA VSMCs than in IRB VSMCs (Figures 5.13, 5.32, 5.33 and 5.34).

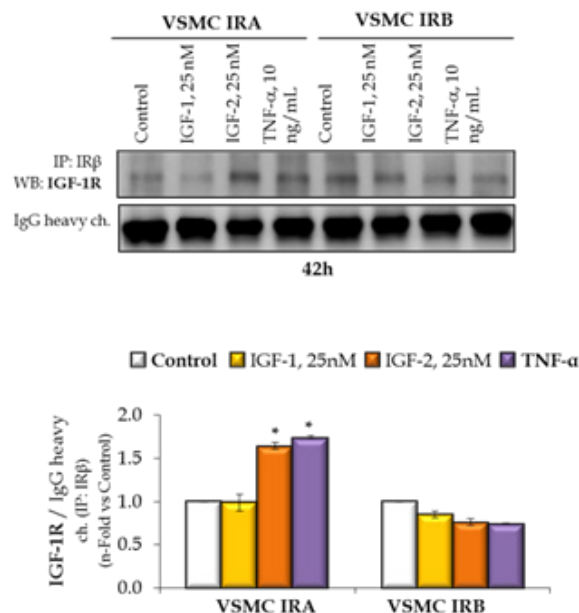


Figura 5.35. Formación de receptores híbridos IR-IGF-1R. Asociación de las isoformas del receptor de la insulina e IGF-1R. Experimentos realizados en las células IRA e IRB VSMCs. Se inmunoprecipitó frente al receptor de la insulina y se estudió su asociación con IGF-1R. Inmunoprecipitación (IP) y Western blot (WB). *p < 0.05 vs. control.

Figure 4.35. IR-IGF-1R hybrid receptors formation. Association between isoform insulin receptor and IGF-1R. The experiments were performed in IRA and IRB VSMCs. Immunoprecipitated against insulin receptor and its association with IGF-1R was studied. Immunoprecipitation (IP) and Western blot (WB). *p < 0.05 vs. control.

5.1.7. Expresión de IGF-1R y su asociación con IRA en los modelos experimentales de daño vascular

Anteriormente, se mostró que *in vitro* existe un aumento de la expresión de IRA e IGF-1R, así como de la asociación de ambos receptores. Con el fin de conocer si la asociación IGF-1R con las isoformas IRA o IRB, podrían tener importancia en condiciones fisiopatológicas, primero se midió los niveles de expresión de IGF-1R en los dos modelos experimentales empleados que presentan alteraciones a nivel vascular (ApoE^{-/-} de 24 semanas y BATIRKO de 52 semanas) (Figura 5.36).

Se observó un aumento significativo de la expresión de IGF-1R en ambos modelos experimentales. Además, el tratamiento con anti-TNF- α redujo significativamente no sólo la expresión de IRA como habíamos visto previamente sino la del IGF-1R (Figura 5.36).

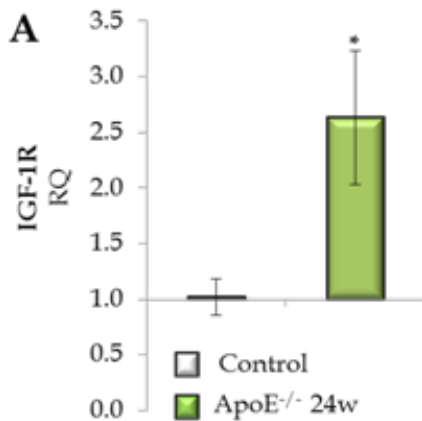


Figura 5.36. Análisis de la expresión de IGF-1R por qRT-PCR en la aorta de ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas (A), BATIRKO de 52 semanas y BATIRKO tratados con anti-TNF- α (B). * $p < 0.05$ vs. sus respectivos controles; + $p < 0.05$ vs. BATIRKO de 52 semanas.

Finalmente, para evidenciar la implicación de la asociación del IGF-1R con las isoformas del IR en condiciones patológicas, se realizaron inmunoprecipitaciones con extractos de proteínas provenientes de aortas de los dos modelos animales (Figura 5.37).

5.1.7. Expression of IGF-1R and its association with ARF in experimental models of vascular injury

Previously, it was showed that, *in vitro*, there was an increase of IRA and IGF-1R expression as well as both receptors association. With the aim at knowing if IGF-1R association with IRA or IRB isoform may have an importance in physiopathological conditions, IGF-1R expression were first measured in two experimental models presenting alterations at vascular level (24-week-old ApoE^{-/-} mice and 52-week-old BATIRKO mice) (Figure 5.36).

Significant increases in the expression of IGF-1R were observed in both animals experimental models. Furthermore, anti-TNF- α treatment not only significantly reduced the expression of as IRA, as previously we had seen, it also reduced IGF-1R expression (Figure 5.36).

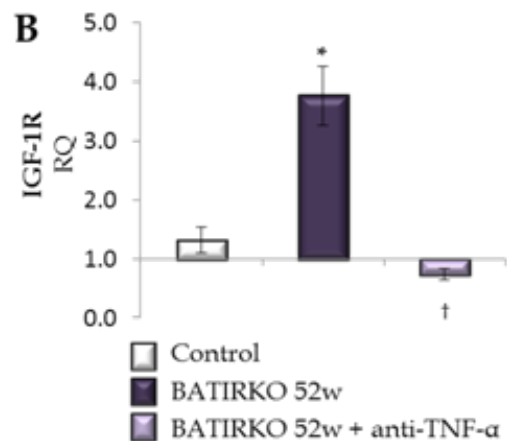


Figure 5.36. Analysis of IGF-1R expression by qRT-PCR in the aorta from 24-week-old ApoE^{-/-} mice (A) and 52-week-old BATIRKO mice with or without anti-TNF- α treatment (B). * $p < 0.05$ vs. each control; + $p < 0.05$ vs. 52-week-old BATIRKO mice.

At last, to demonstrate the involment of the association between IGF-1R and IR isoforms in pathological conditions, immunoprecipitations were carried out with protein extracts coming from aorta of both experimental models (Figure 5.37).

Para los lisados proteicos, se utilizaron un conjunto de 5 aortas de los animales ApoE^{-/-} de 24 semanas y sus respectivos controles. Sin embargo, se utilizaron aortas individuales a partir de 3 ratones por cada uno de los grupos: control de 52 semanas, BATIRKO de 52 semanas y BATIRKO tratados con anti-TNF- α . Se inmunoprecipitaron 150 gramos de proteínas de los lisados proteicos dos veces frente al anticuerpo que reconoce exclusivamente la isoforma IRB. Los sobrenadantes de la segunda inmunoprecipitación se inmunoprecipitaron con IR β (que reconoce ambas isoformas del IR). Por lo tanto, los complejos inmunes que estuvieran unidos únicamente a la isoforma IRA, se sometieron a SDS-PAGE. Por último, la inmunotransferencias se incubaron con el anticuerpo anti-IGF-1R para determinar la asociación entre la isoforma IRA y el IGF-1R.

En último lugar, se demostró que tanto la expresión de IGF-1R, así como su asociación con IRA están aumentados de forma significativa en la arteria aorta de ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas y en BATIRKO de 52 semanas (Figura 5.37.A y B, respectivamente). Se observó que bajo condiciones vasculares patológicas *in vivo* aumenta la expresión de IGF-1R y de la isoforma A del IR así como su asociación. No se presentó asociación de IGF-1R con IRB. Más importante aún, el tratamiento con anti-TNF- α disminuyó la sobreexpresión del IGF-1R, así como el aumento de su asociación con la isoforma IRA observado en la aorta de ratones BATIRKO de 52 semanas de edad (Figura 5.37.B).

For the protein lysis, a pool of 5 aortas of 24-week-old ApoE^{-/-} mice and their respective controls were used. However, single aortas were extracted from 3 mice in each control, 52-week-old BATIRKO mice and 52-week-old BATIRKO mice treated with anti-TNF- α . 150 mg of protein lysates were immunoprecipitated twice with the antibody which only recognises IRB isoform. Supernatants from the second immunoprecipitation were once again immunoprecipitated with IR β (which recognises both IR isoforms). Therefore, immune complexes bound only IRA isoform, were subjected to SDS-PAGE. Finally, the immunoblots were incubated with the anti-IGF-1R antibody to assess the association between IRA and IGF-1R.

Eventually, it was demonstrated that not only IGF-1R expression as well as its association with IRA were significantly increased in the aorta from 24-week-old ApoE^{-/-} mice and 52-week-old BATIRKO mice (Figure 5.37.A and B, respectively). It was observed that under vascular pathological conditions *in vivo*, IGF-1R and IRA increases their expression as well as their association. No association appeared between IGF-1R and IRB. More importantly, anti-TNF- α treatment decreased IGF-1R expression and its association with the IRA isoform observed in the aorta from 52-week-old BATIRKO mice (Figure 5.37.B).

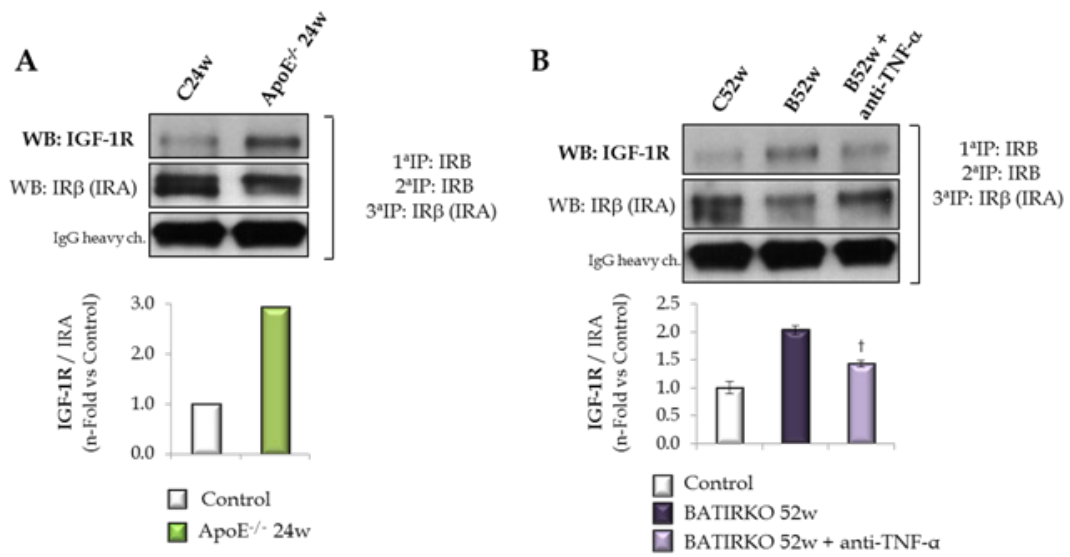


Figura 37*. Asociación del IGF-1R con la isoforma IRA en la aorta de ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas (A), BATIRKO de 52 semanas y BATIRKO tratados con anti-TNF-α (B). *p<0.05 vs. cada control; †p<0.05 vs. BATIRKO de 52 semanas..**

Figure 37. IGF-1R and IRA association in aorta from 24-week-old ApoE^{-/-} mice (A) and 52-week-old BATIRKO mice with or without anti-TNF-α treatment (B). *p<0.05 vs. each control; †p<0.05 vs. 52-week-old BATIRKO mice.

5 RESULTADOS RESULTS

Parte II

Part II

5.2. Papel de la UCP2 y el oleato en la protección en el daño vascular

5.2 Role of UCP-2 and oleic acid in the prevention of cardiovascular damage

5.2.1. Efecto diferencial del TNF- α y la insulina en la expresión de UCP-2 en las células vasculares

5.2.1 TNF- α and insulin differential effect in the expression of UCP-2 in vascular cells.

Para la segunda parte de este tesis, utilizamos las líneas celulares residentes de la pared vascular, como son las células endoteliales (clone 2167, ECs), y las células de músculo liso vascular de tipo silvestre (VSMCs). También, hemos utilizado células de músculo cardiaco (CMs) con el fin de ampliar el estudio a la patología cardiovascular.

In the second part of this thesis, we used cell lines located within the vascular wall, such as endothelial cells (clone 2167, ECs), and wild type vascular smooth muscle cells (VSMCs). Cardiac muscle cells (CMs) were used as well in order to widen the study of cardiovascular pathology.

En primer lugar, caracterizamos la línea de ECs que fue adquirida de la ATCC. Realizamos marcaje de superficie con el anticuerpo CD31, también llamado molécula de citoadhesión a células endoteliales y plaquetas (PECAM-1) conjugado con FITC y su control de isotipo IgG2. En el primer histograma biparamétrico se observó la fluorescencia del anticuerpo no inmunogénico FITC-IgG2, y en el segundo se observó el desplazamiento de las células endoteliales marcadas con el anticuerpo CD31 al cuadrante FL1 (Figura 5.38.A).

First of all, we characterized the ECs line obtained from the ATCC. We did a surface marking with CD31 antibody, called platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) combined with FITC and its isotype control IgG2. The first biparametric histogram represents the fluorescence of the non-immunogenic antibody FITC-IgG2, and the second one shows the displacement of the marked endothelial cells with CD31 antibody in the FL1 quadrant (Figure 5.38.A).

Normalmente, CD31 se encuentra en las células endoteliales, plaquetas, macrófagos, linfocitos, megacariocitos, osteoclastos y neutrófilos (Privratsky & Newman 2014). CD31 es un marcador de las células endoteliales diferencial de los otros tipos celulares presentes en

Normally, CD31 is found in endothelial cells, platelets, macrophages, lymphocytes, megakaryocytes, osteoclasts and neutrophils (Privratsky & Newman 2014). CD31 is a

marker for endothelial cells, differentiating these cells from the others cell types present in the vessels. CD31 antibody marking in ECs was considered positive, and thus, the cells

el vaso. El marcaje para el anticuerpo CD31 en las ECs se interpretó como positivo, y así, las células fueron validadas como células endoteliales.

No obstante, estas células endoteliales también expresan otros marcadores como el factor de von Willebrand (vWF) (van Gils et al. 2009; Crisan et al. 2012). vWF es una glicoproteína plasmática multimérica, esencial para la hemostasia primaria, que media la formación de tapón de plaquetas a través de la adhesión en el sitio de la lesión. Está presente constitutivamente en los cuerpos de Weibel-Palade del endotelio (Berber 2012).

Además, el vWF protege al factor VIII de la degradación proteolítica mediante unión no covalente entre ellos. vWF se sintetiza en forma de pre-pro-polipéptido (pre-pro-vWF) en las células endoteliales y megacariocitos.

En segundo lugar, realizamos un doble marcaje con los anticuerpos anti-vWF y DAPI por inmunofluorescencia. El vWF no solo es un marcador de caracterización de la célula endotelial sino que también es un marcador de la funcionalidad de estas células (Crisan et al. 2012). Mediante inmunofluorescencia, detectamos la expresión de vWF en los cuerpos de Weibel-Palade y en las células endoteliales (en rojo). Además, co-localizamos los núcleos con DAPI (en azul) (Figura 5.38.B).

were authenticating as endothelial cells.

However, these endothelial cells express as well other markers such as von Willebrand factor (vWF) (van Gils et al. 2009; Crisan et al. 2012). vWF is a multimeric plasma glycoprotein, essential for primary hemostasis, which measures platelet plug formation through platelet adhesion at the site of the lesion. This adhesion is constitutively present in Weibel-Palade bodies of the endothelium (Berber 2012). On top of that, vWF protects Factor VIII from proteolytic degradation by means of covalent bonding between them. vWF is synthesised in a prepro-polypeptid form (prepro-vWF) in endothelial cells and megakaryocytes.

In the second place, we used a double-marking with anti-vWF and DAPI antibodies by immunofluorescence. vWF is not only a marker for endothelial cells characterization, it is also a marker of the functionality of these cells (poner referencia). Through immunofluorescence, we detected vWF expression in Weibel-Palade bodies and in endothelial cells (in red). Moreover, we co-located the nuclei with DAPI (in blue) (Figure 5.38.B).

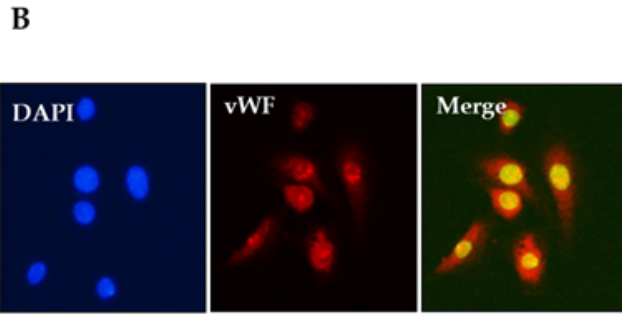
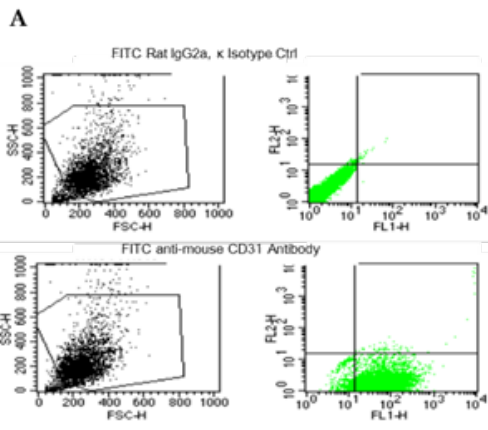


Figura 5.38. Caracterización de la línea de células endoteliales (ECs). A. Histograma biparamétrico de citometría de flujo en las células endoteliales: marcaje en verde con el anticuerpo FITC anti-mouse CD31 y como control de isotipo se utilizó FITC-IgG2. B. Las células endoteliales fueron marcadas con el anticuerpo de vWF (rojo), núcleos celulares (azul) y superposición de las imágenes por inmunofluorescencia (merge).

Figure 5.38. Characterization of the endothelial cells (ECs) line. A two-parameter flow cytometric histogram in endothelial cells: green staining with FITC anti-mouse CD31 antibody and isotype control and FITC-IgG2 was used. B. Endothelial cells were labeled with vWF antibody (red), cell nuclei (blue) and overlay images by immunofluorescence (merge).

A continuación, realizamos estudios de señalización en respuesta a insulina en las ECs, analizando ambas vías de señalización (PI3K y MAPKs). Las células fueron estimuladas con diferentes dosis de insulina a 1 nM, 10 nM o 100 nM, que nos permitiera conocer la menor concentración de insulina a la cual las rutas de señalización están activas. Se observó, que a partir de la dosis más baja de insulina (1 nM), se indujo la fosforilación en AKT (T308) y ERK1/2 (T202/Y204) tanto a los 5 minutos como a los 10 minutos. Se observó un aumento significativo en la fosforilación de AKT a 10 y 100 nM. Sin embargo, la fosforilación en ERK1/2 se mantuvo constante a las diferentes dosis a los 5 minutos. Por otro lado, a los 10 minutos solo se presentó un aumento significativo en la fosforilación de AKT con insulina 100 nM. Los niveles de fosforilación de las proteínas AKT y ERK fueron normalizadas frente al nivel endógeno de β -actina (Figura 5.39).

Next, we run signaling studies in response to insulin in ECs, analyzing two signalling pathways (PI3K and MAPKs). Cells were stimulated with various insulin doses of 1 nM, 10 nM or 100 nM, which allowed us to assess the minimum insulin concentration for which the signalling ways are activated. With the lowest insulin dose (1 nM), phosphorylation was induced in AKT (T308) and ERK1/2 (T202/Y204) at 5 minutes as well as 10 minutes. A significant increase in AKT phosphorylation was observed at 10 and 100 nM. However, ERK1/2 stayed constant at different doses for the 5 minutes. On the other side, at 10 minutes, a significant increase in AKT phosphorylation only appeared with a 100 nM insulin dose. Phosphorylation levels in AKT and ERK proteins were normalized with antibody against beta actin (Figure 5.39).

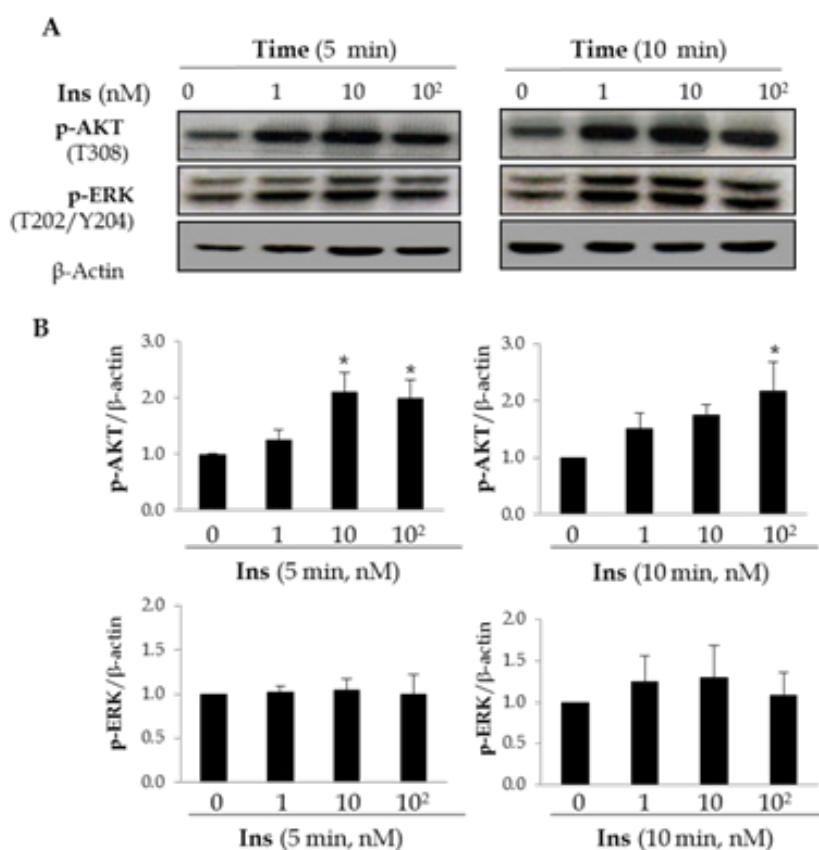


Figura 5.39. Señalización de la insulina, tanto de la vía PI3K como MAPK en células endoteliales. A. Western blots de la fosforilación de AKT (T308) y ERK (T202/T204) a diferentes dosis de insulina (1 nM, 10 nM y 100 nM) a los 5 y 10 minutos. B. Cuantificación de la fosforilación de AKT y ERK. Los experimentos se realizaron al menos tres veces. Se normalizó frente al nivel endógeno de β-actina. * $p < 0.05$ vs. control.

Figure 5.39. Both PI3K and MAPK insulin signaling pathway in endothelial cells. A. Western blots of the phosphorylation of AKT (T308) and ERK (T202/T204) at different doses of insulin (1 nM, 10 nM and 100 nM) at 5 and 10 minutes. B. Quantification of phosphorylation of AKT and ERK. Experiments were performed at least three times. They were normalized against the endogenous level of β-actin. * $p < 0.05$ vs. control.

Aunque es bien conocido el papel protector de UCP-2 frente al daño vascular en las primeras etapas de la arteriosclerosis (Blanc et al. 2003), es completamente desconocida la relación entre la insulina o el TNF- α con UCP-2 en las células vasculares. Por lo tanto, hemos abordado esta cuestión en las células ECs y VSMCs, como componentes principales de la pared vascular.

En primer lugar, realizamos curvas de tiempo en respuesta a insulina 10 nM, en ambas líneas celulares (desde 10 minutos hasta las 24 horas) y valoramos su efecto en la expresión de UCP-2. Se observó que la insulina aumentó significativamente los niveles de UCP-2 en las

Even, if the protecting role of UCP-2 in vascular damage is well known in the earlier stage of arteriosclerosis (Blanc et al. 2003), the relationship between insulin or TNF- α and UCP-2 in vascular cells is completely unknown. For this reason, we addressed this issue in ECs and VSMCs, as main components of the vascular wall.

First, we performed time courses in response to insulin 10 nM, in both cell lines (from 10 minutes to 24 hours) and we assessed its effect on the expression of UCP-2. It was observed that insulin significantly increased UCP-2 levels in endothelial cells at 4, 8 and 18 hours; with the maximum stimulation at 18 hours.

células endoteliales a las 4, 8 y 18 horas, siendo el máximo de estimulación a las 18 horas. Sin embargo, en las VSMCs la insulina indujo un aumento significativo desde la primera hora hasta las 24 horas, teniendo la máxima expresión a las 4 horas, mostrando así un comportamiento diferencial entre ambas líneas celulares (Figura 5.40).

However, in VSMCs insulin induced a significant increase from the first time analysed until 24 hours with a maximum expression at 4 hours, showing a differential behaviour between the two cell lines (Figure 5.40).

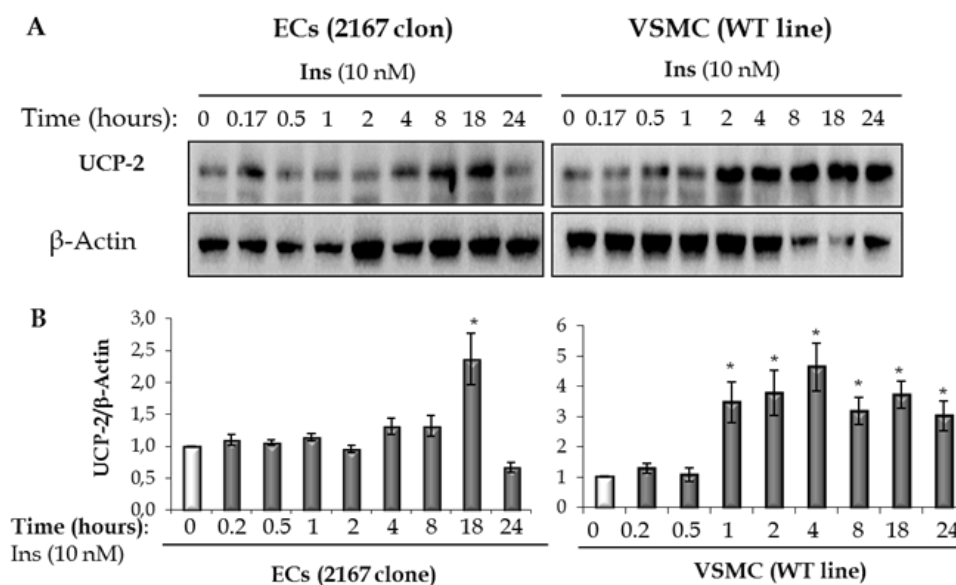


Figura 5.40. Expresión de UCP-2 inducida por insulina a diferentes tiempos. A. Geles representativos de los Western blots de la expresión de UCP-2 inducida en respuesta a insulina (10 nM), en células endoteliales (panel de la izquierda) y en células de músculo liso vascular (panel de la derecha). B. Cuantificación de la expresión proteica de UCP-2. Los experimentos se realizaron al menos tres veces. Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. * $p < 0.05$ vs. control.

Figure 5.40. UCP-2 expression induced by insulin at different times. A. Western blots representative gels of UCP-2 expression induced insulin (10 nM) in endothelial cells (left panel) and vascular smooth muscle cells (right panel). B. Quantification of UCP-2 protein expression. Experiments were performed at least three times. It was normalized against the endogenous level of β -actin. * $p < 0.05$ vs. control.

Las ECs y las VSMCs fueron tratadas con TNF- α a 10ng/mL durante 2 horas. Posteriormente, las células fueron estimuladas con insulina a 10 nM durante 10 minutos. Observamos que el TNF- α induce resistencia a la insulina tanto en las células de músculo liso vascular como en las células endoteliales. Esto fue evidente por las disminuciones significativas en los niveles de fosforilación de AKT, p70S6K y ERK1/2 (Figura 5.41A).

ECs and VSMCs were treated with TNF- α at 10ng/mL during 2 hours. Subsequently, the cells were stimulated with insulin at 10 nM for 10 minutes. We observed an induction of insulin resistance by TNF- α in vascular smooth muscle cells as well as in endothelial cells. It was clear because of the significant decrease in the phosphorylation levels in AKT, p70S6K and ERK1/2 (Figure 5.41.A).

Basado en estos datos, queríamos ver si el TNF- α además de producir resistencia a la insulina vascular podría tener algún efecto sobre

On the basis of these data, we wanted to see if TNF- α could have any effect on the expression of UCP-2 as its ability to induce vascular insulin resistance. Concerning this, in figure 40, we already observed that insulin induced

la expresión de UCP-2. Para ello, en la Figura 40 ya habíamos observado que la insulina inducía el aumento significativo máximo de UCP-2 a las 4 y 18 horas en VSMCs y ECs, respectivamente. Además, se observó que el pretratamiento con el TNF- α durante 2 horas disminuyó significativamente los niveles proteicos de UCP-2 inducido por insulina en ambos tipos celulares (Figura 5.41.B). Por tanto, el TNF- α induce resistencia a la insulina vascular y una reducción significativa de los niveles de UCP-2, a nivel basal o inducida por insulina en células vasculares (Figura 5.41.B).

significantly UCP-2 maximal increase at 4 and 18 hours, in VSMCs and ECs, respectively. In addition, it was observed that a pre-treatment with TNF- α during 2 hours significantly decreased in UCP-2 protein levels induced by insulin in both cells types (Figure 5.41.B). Therefore, TNF- α induces insulin vascular resistance and a significant reduction of UCP-2 levels, in basal level or induced by insulin in vascular cells (Figure 5.41.B).

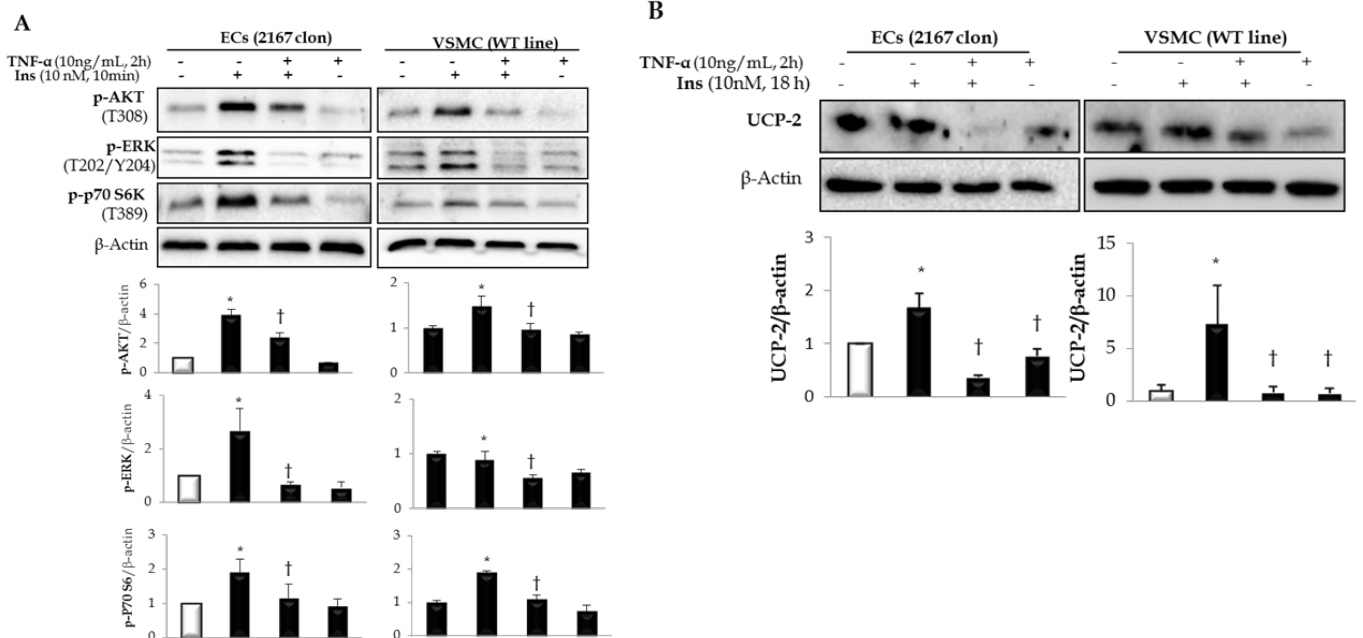


Figura 5.41. Efecto del TNF- α sobre la señalización de la insulina y la expresión de UCP-2. A. Geles representativos de los Western blots y sus cuantificaciones del efecto del TNF- α sobre la señalización de la insulina en ECs (panel de la izquierda) y VSMCs (panel de la derecha). B. Geles representativos de los Western blots y sus cuantificaciones del efecto del TNF- α sobre la expresión proteica de UCP-2 en ECs y VSMCs. Los experimentos se realizaron al menos tres veces. Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. estímulo.

Figure 5.41. Effect of TNF- α on insulin signaling and expression of UCP-2. A. Western blots representative gels and quantifications of TNF- α effect on insulin signaling in ECs (left panel) and VSMCs (right panel) B. Western blots representative gels and quantification of TNF- α effect of on the UCP-2 protein expression in ECs and VSMCs. Experiments were performed at least three times. They were normalized against the endogenous level of β -actin. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. stimuli.

5.2.2. Papel protector de UCP-2 frente a la acumulación lipídica y el daño vascular

5.2.2.1. Niveles de UCP-2 en el modelo ApoE^{-/-} sometido a dieta occidental

En la primera parte de este estudio se describe el modelo animal ApoE^{-/-} como un modelo de aterosclerosis, con un aumento significativo del infiltrado de macrófagos y de la acumulación lipídica en la aorta. En esta segunda parte, se intentó correlacionar la acumulación lipídica y el daño vascular presente en este modelo con los niveles de UCP-2.

El modelo murino ApoE^{-/-} fue sometido a dieta occidental, y estudiamos diferentes parámetros, fisiológicos y metabólicos, a las 8, 12, 18 y 24 semanas de edad (Tabla 5.2). Realizamos mediciones de la masa del tejido adiposo marrón (BAT) y del tejido adiposo blanco (WAT) en relación al peso corporal. Se observó que no existen diferencias significativas con respecto a los controles en el peso corporal, ni en relación con BAT y WAT a las diferentes semanas. Tampoco, observamos cambios significativos en los niveles de glucosa e insulina. Sin embargo, ApoE^{-/-} sometido a dieta grasa presentó un aumento significativo en los niveles de triglicéridos y colesterol con respecto a sus controles, siendo mayores las diferencias a mayor edad y a mayor tiempo de ingesta de la dieta occidental.

5.2.2 UCP-2 protecting role against lipid accumulation and vascular damage

5.2.2.1. UCP-2 levels in ApoE^{-/-} model fed upon occidental diet

In the first part of this study, ApoE^{-/-} animal model is described as a model of atherosclerosis, with a significant increase of macrophage infiltration and lipid accumulation in the aorta. In this second part, we attempted to correlate the lipid accumulation with the vascular damage existing in this model with UCP-2 levels.

Murine model ApoE^{-/-} was fed upon occidental diet and we studied several, physiological and metabolic parameters, at 8, 12, 18 and 24 weeks of age (Table 5.2). We measured the mass of brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) in relation to body weight. We observed that no significant difference neither in body weight nor in BAT nor in WAT existed compared with their control groups. Neither had we observed significant changes in glucose and insulin levels. However, ApoE^{-/-} subjected to a fat diet showed a significant increase in triglyceride and cholesterol levels compared to the control group; the differences being bigger for elder mice and for the longest occidental diet ingestion time.

	8 weeks		12 weeks		18 weeks		24 weeks	
	Control	ApoE ^{-/-}	Control	ApoE ^{-/-}	Control	ApoE ^{-/-}	Control	ApoE ^{-/-}
Body weight (g)	20.4±0.1	21.3±0.6	24.7±0.5	24.3±0.5	27.7±1	26.5±0.3	28.3±1	30.5±1
BAT (mg)/BW (g)	3.9±0.02	2.8±0.6	4.3±0.4	3.7±0.4	4.1±0.7	3.0±0.1	4.7±0.5	3.4±0.5
WAT (mg)/BW (g)	10.5±0.8	11±0.6	12.2±2.7	17±0.2	14.7±2	17.5±1	22±4	27±1
Glucose (mg/dL)	80.5±6.5	79±13	83±4	104±15	110.9±12	106±4	117±1	101±11
Insulin (ng/mL)	0.24±0.003	0.3±0.1	0.25±0.02	0.32±0.02	0.26±0.02	0.35±0.04	0.24±0.02	0.3±0.01
Cholesterol (mg/dL)	79.1±13	461±39;*	109.4±8.4	565.3±48.8;*	122.05±12	569.8±18;*	120 ± 5	603.9±31;*
TG (mg/dL)	43.4±1.6	53.9±25;*	36.6±5	56.9±8;*	62.3±12	73.2±5;*	57.2 ± 8	110 ± 12;*

*Tabla 5.2. Caracterización del modelo animal ApoE^{-/-} a las 8, 12, 18 y 24 semanas. Cuadro comparativo del modelo ApoE^{-/-} donde se analizaron diversos parámetros como el peso corporal, los ratios de los tejidos adiposos (BAT y WAT) respecto al peso corporal y la concentración de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos en el modelo ApoE^{-/-} sometido a dieta occidental (21% de grasa) a diferentes semanas de edad. *p<0.05 vs. cada Control.*

*Table 5.2. Characterization of 8, 12, 18 and 24-week-old ApoE^{-/-} animal model. Comparison table of ApoE^{-/-} model, where various parameters such as body weight, the ratios of adipose tissues (BAT and WAT) to body weight and the concentration of glucose, insulin, cholesterol and triglycerides were analyzed in the model ApoE^{-/-} subjected to Western (21% fat) diet at different weeks of age. *p<0.05 vs. each Control.*

Se realizó la caracterización de la lesión aterosclerótica de los ratones ApoE^{-/-} y sus respectivos controles a las 8, 12, 18 y 24 semanas de edad. Primero, analizamos los depósitos de lípidos mediante tinción con Oil-Red contrastada con hematoxilina en los arcos aórticos de los diferentes grupos del modelo. Se observó que los animales ApoE^{-/-} con el tiempo desarrollaron progresivamente mayor área de lesión, con mayor acumulación lipídica en los arcos aórticos (Figura 5.42).

Characterization of the atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice and its respective controls at 8, 12, 18 and 24 weeks-old was performed. First, we analysed the lipids depots in the aortic roots of the various models with Oil-Red staining counterstained with hematoxylin. We observed that ApoE^{-/-} animals developed, progressively over time, greater lesion area, with higher lipid accumulation in the aortic roots (Figure 5.42).

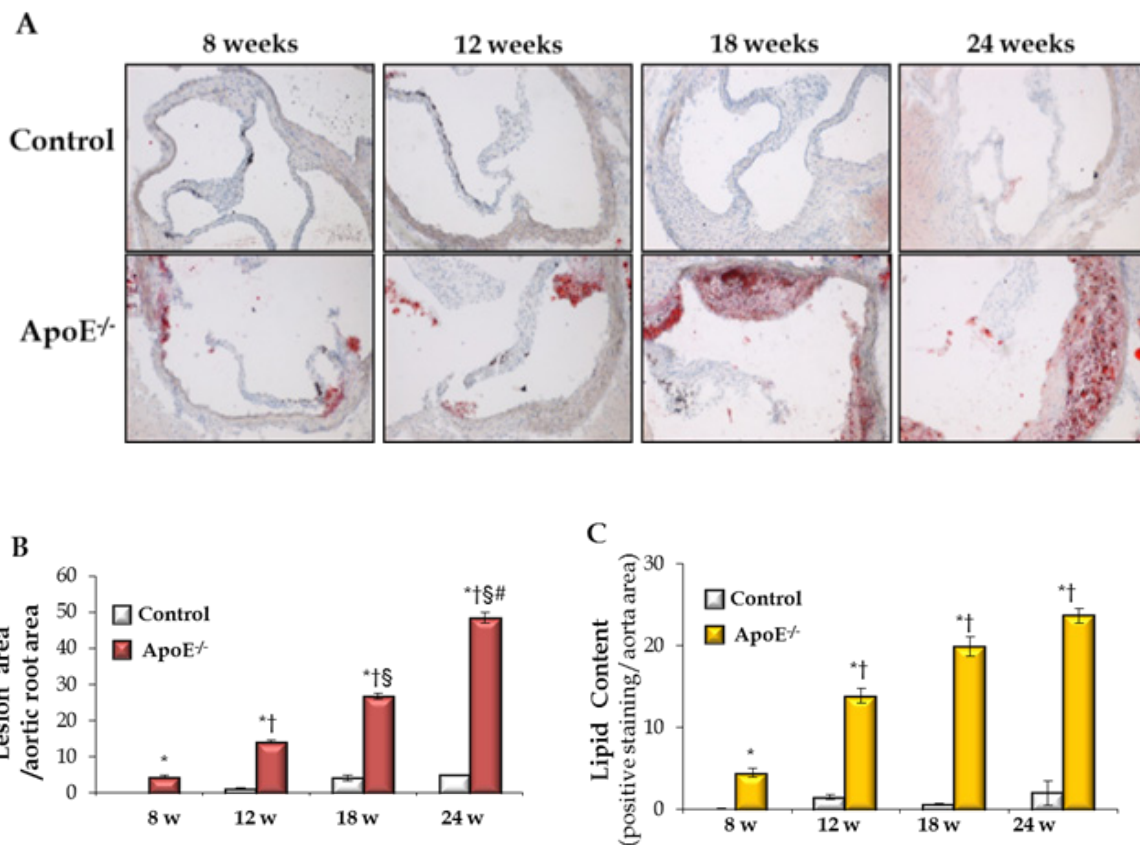


Figura 5.42. Caracterización de la lesión arteroesclerótica en el modelo animal ApoE^{-/-} bajo dieta grasa. A. Tinción de Oil-red en arcos aórticos de animales ApoE^{-/-} de 8, 12, 18 y 24 semanas de edad y sus respectivos controles. B. Gráficos del área de la lesión de animales ApoE^{-/-} de 8, 12, 18 y 24 semanas de edad y sus respectivos controles. (% área de lesión / área de aorta). * $p < 0.05$ vs. cada Control; † $p < 0.05$ vs. ApoE^{-/-} 8w; § $p < 0.05$ vs. ApoE^{-/-} 12w; # $p < 0.05$ vs. ApoE^{-/-} 18w. C. Gráficos del contenido lipídico en el arco aórtico de animales ApoE^{-/-} de 8, 12, 18 y 24 semanas de edad y sus respectivos controles. (% de grasa de depósito / área de la aorta). * $p < 0.05$ vs. cada Control; † $p < 0.05$ vs. ApoE^{-/-} 8w.

Figure 5.42. Characterization of the atherosclerotic lesion in the animal model ApoE^{-/-} fed low fat diet. A. Oil-red staining in aortic arches of 8, 12, 18 and 24-week-old ApoE^{-/-} mice and their respective controls. B. Graph lesion area animal of 8, 12, 18 and 24-week-old ApoE^{-/-} mice and their respective controls. (% Lesion area / area of aorta). * $p < 0.05$ vs. each control; † $p < 0.05$ vs. 8-wk-old ApoE^{-/-}; § $p < 0.05$ vs. 12-wk-old ApoE^{-/-}; # $p < 0.05$ vs. 18-wk-old ApoE^{-/-}. C. Graphics lipid content in the aortic arch of of 8, 12, 18 and 24-week-old ApoE^{-/-} mice and their respective controls. (% lipid deposit / aorta area). * $p < 0.05$ vs. each Control; † $p < 0.05$ vs. 8-wk-old ApoE^{-/-}.

Analizamos la expresión del mRNA para UCP-2 por qRT-PCR y su probable relación con el área de la lesión y el contenido lipídico (Figura 5.43.A). Se observó un aumento significativo de los niveles del mensajero para UCP-2 en la aorta de los ratones ApoE^{-/-} de 8 semanas de edad, en comparación con sus correspondientes controles. Este aumento de UCP-2 podría ser un mecanismo compensatorio ante el inicio de la acumulación lipídica y el proceso ateroesclerótico. Sin embargo, los niveles de UCP-2 disminuyeron marcadamente en los ratones

We analysed UCP-2 mRNA expression with qRT-PCR and its probable relationship with the lesion area and the lipid content (Figure 5.43.A). We observed a significant increase of messenger for UCP-2 in 8-week-old ApoE^{-/-} mice compared to its corresponding controls. This UCP-2 increase may be a compensatory mechanism to the beginning of lipid accumulation and the atherosclerotic process. However, UCP-2 levels strongly decreased in ApoE^{-/-} mice between 12 and 24 weeks old, when the vascular damage and the lipid depots were

ApoE^{-/-} entre las 12 y las 24 semanas de edad, cuando el daño vascular y los depósitos lipídicos son mucho mayores. Por lo tanto, hemos establecido que existe una correlación negativa y significativa entre los niveles de UCP-2 y el área de la lesión y la acumulación lipídica en la arteria aorta (Figura 5.43.B).

so much higher. This is why we established a negative and significant correlation exists between UCP-2 levels, the lesion area and lipid accumulation in the aortic artery (Figure 5.43.B).

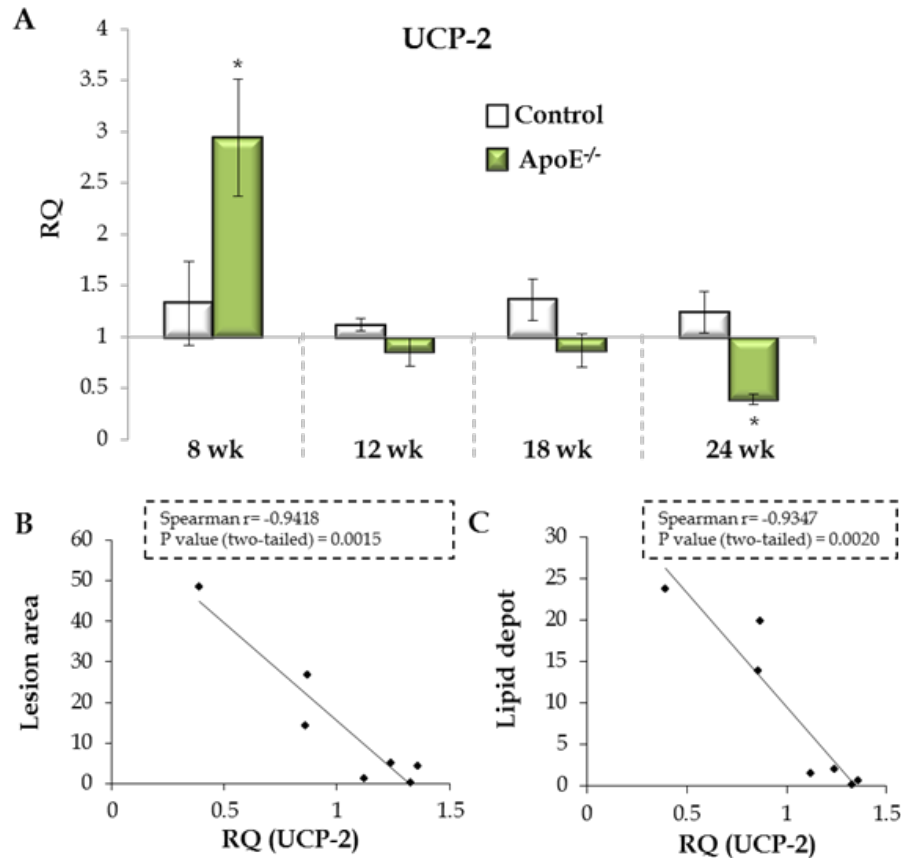


Figura 5.43. Niveles de UCP-2 en la aorta del ratón ApoE^{-/-} y la correlación de los niveles de UCP-2 con el área de lesión y la acumulación lipídica. A. Niveles del mRNA de UCP-2 en la aorta de animales ApoE^{-/-} y sus respectivos controles (8, 12, 18 y 24 semanas) por qRT-PCR. B. Gráficos de correlación de Spearman entre el área de la lesión y los niveles de UCP-2. C. Gráficos de correlación de Spearman del contenido lipídico y los niveles de UCP-2 en la aorta.

Figure 5.43. UCP-2 levels aorta of ApoE^{-/-} mice and the correlating UCP-2 levels of in the area lesion and lipid accumulation. A. UCP-2 mRNA levels in the aorta of animals ApoE^{-/-} and their respective controls (8, 12, 18 and 24 weeks-old) by qRT-PCR. B. Spearman correlation graphic between lesion area and levels of UCP-2. C. Spearman correlation graphics between lipid content and UCP-2 levels in the aorta.

También, analizamos y cuantificamos la expresión proteica de UCP-2 por Western blot, en la aorta de los animales ApoE^{-/-} de 24 semanas. Estos animales presentaron los niveles más bajos de mRNA para UCP-2 con un concomitante aumento del área de lesión y la acumulación de lípidos en la aorta en comparación con los otros grupos de ApoE^{-/-} y sus respectivos

Likewise, we analysed and quantified UCP-2 protein expression in the aorta of 24-week-old ApoE^{-/-} animals by Western blot. These animals showed the lowest UCP-2 mRNA levels with a concomitant increase of the lesion area and aortic lipid accumulation compared to the others ApoE^{-/-} groups and their respective controls fed upon occidental diet. We

controles bajo dieta occidental. Se observó una disminución significativa de los niveles de expresión de la proteína UCP-2 en la aorta de los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas en comparación con sus correspondientes controles de 24 semanas. Estos resultados son coherentes con los hallazgos anteriores y refuerzan la idea del papel protector de UCP-2 frente al daño vascular (Figura 5.44).

observed a significant decreased in UCP-2 protein expression levels in aorta of 24-week-old ApoE^{-/-} mice compared to the 24-week-old Control mice. These results are consistent with previous findings and reinforce the idea of a protector role of UCP-2 against vascular damage (Figure 5.44).

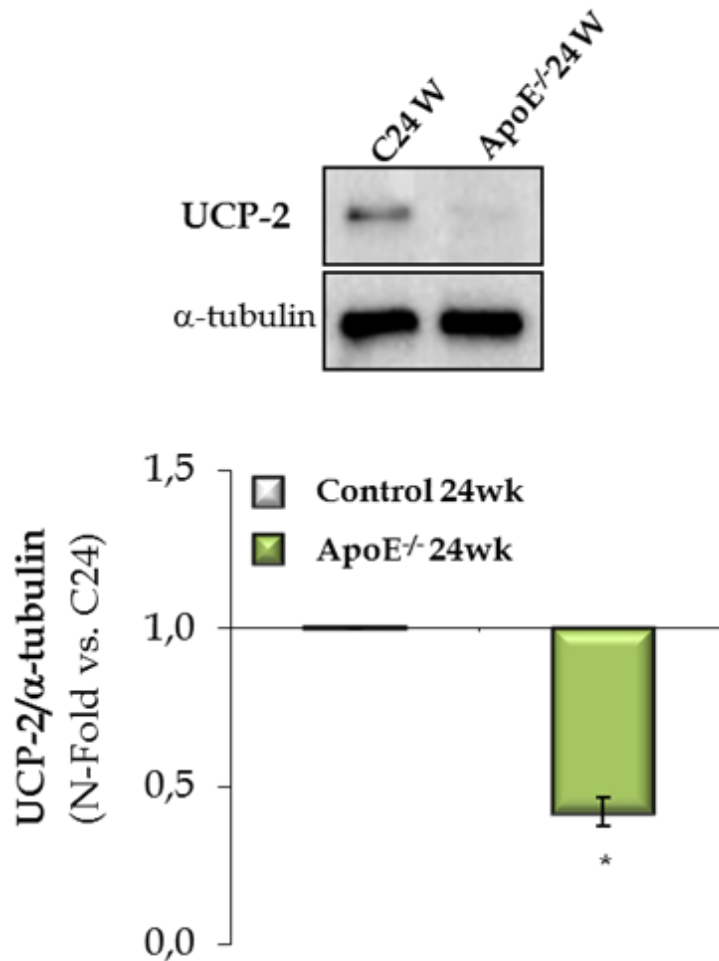


Figura 5.44. Niveles de proteína de UCP-2 en la arteria aorta de ratones ApoE^{-/-} y sus controles de 24 semanas. Mediante Western blot se analizó y cuantificó los niveles proteicos de UCP-2 en la arteria aorta de ratones ApoE^{-/-} y de sus controles de 24 semanas de edad. Se normalizó frente al nivel endógeno de α-tubulina. *p<0.05 vs. Control.

Figure 5.44. UCP-2 protein levels in the aorta of 24 weeks-old ApoE^{-/-} mice and their Controls. By Western blot, UCP-2 protein levels in the aorta of 24 weeks-old ApoE^{-/-} mice and their controls was analyzed and quantified. It was normalized against the endogenous level of α-tubulin. *p<0.05 vs. Control.

5.2.2.2. Niveles de UCP-2 en el modelo BATIRKO con dieta rica en grasa (HFD)

El segundo modelo estudiado es el animal BATIRKO de 33 semanas bajo dieta alta en grasa (HFD) durante 16 semanas (BATIRKO HFD). Estos ratones presentaron una lipomatosis marrón severa, obesidad (principalmente en el compartimiento gonadal del WAT), intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Guerra et al. 2001). Animales de tipo silvestre bajo HFD durante 16 semanas fueron utilizados como Controles.

En primer lugar, se caracterizó el modelo BATIRKO HFD, y se midieron la masa del WAT y BAT en relación al peso corporal y los niveles de glucosa e insulina (Tabla 5.3). En segundo lugar, se realizaron curvas de tolerancia a la insulina y glucosa y tests de secreción de insulina (Figura 5.45). De manera general, el modelo BATIRKO HFD presentó resistencia a la insulina debido al aumento de tejido adiposo blanco visceral producido por la administración de HFD. Se obtuvieron dos poblaciones de BATIRKO obesos, en relación al desarrollo o no de mecanismos compensatorios frente a la resistencia a la insulina. El primer grupo de BATIRKO obeso fue el minoritario y era capaz de desarrollar una hiperinsulinemia moderada como un mecanismo compensatorio frente a la resistencia a la insulina (BATIRKO MH). El segundo grupo, mayoritario, no desarrolló mecanismos compensatorios frente a la resistencia a la insulina. Este grupo presentó niveles normales de insulina plasmática (BATIRKO N) y desarrolló hiperglucemia en el ayuno (Tabla 5.3).

5.2.2.2 UCP-2 levels in BATIRKO models fed upon high-fat diet (HFD)

The second model studied is the 33-week-old BATIRKO animal fed upon high-fat diet (HFD) during 16 weeks (BATIRKO HFD). Those mice showed a severe brown lipomatosis, obesity (mainly in the WAT gonadal compartment), glucose intolerance and insulin resistance (Guerra et al. 2001). Wild type animals under HFD fed upon for 16 weeks were used as Controls.

In first place, the BATIRKO HFD model was characterized and WAT and BAT masses in relation to body weight were measured as well as glucose and insulin levels (Table 5.3). In second place, insulin and glucose tolerance curves and insulin secretion tests were performed (Figure 45). Overall, the BATIRKO HFD model showed an insulin resistance due to an increase of the visceral white adipose tissue produced by the HFD ingestion. Two populations of obese BATIRKO were obtained according with the presence or not of compensatory mechanism in insulin-resistance states. The first obese BATIRKO group was the minority one and the group was capable to develop a moderate hyperinsulinemia as a compensatory mechanism against the insulin resistance (BATIRKO MH). The second and majority group did not develop compensatory mechanisms in insulin-resistance stage. This group presented normal levels of plasmatic insulin (BATIRKO N) and developed hyperglycemia during the fasting period (Table 5.3).

	Control	BATIRKO MH	BATIRKO N
Body Weight (g)	27.8 ± 1	29.9 ± 0.3	31.4 ± 0.7
WAT (mg)/ body weight (g)	22.4 ± 3.6	45.5 ± 5.9; *	41.1 ± 3.9 *
BAT (mg)/ body weight (g)	1.9 ± 0.15	0.8 ± 0.08;*	0.6 ± 0.04;*
Insulin (ng/ml)	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2; *	0.42 ± 0.05; †
Glucose (mg/dl)	117 ± 9	122.8 ± 15	138 ± 9;*

Tabla 5.3 Caracterización metabólica del modelo BATIRKO HFD. Cuadro comparativo del peso corporal, los ratios de los tejidos adiposos (BAT y WAT) frente al peso corporal, niveles de insulina y glucosa de animales Control y BATIRKO HFD. Los animales BATIRKO HFD fueron analizados en dos grupos de acuerdo a su fenotipo en BATIRKO MH (BATIRKO con moderada hiperinsulinemia) y BATIRKO N (BATIRKO normoinsulinémicos). * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH.

El primer grupo de BATIRKO obeso, el BATIRKO MH, mostró resistencia a la insulina compensada con una hiperinsulinemia moderada. El modelo BATIRKO MH, presentó una moderada hiperinsulinemia (1.4 ± 0.2 ng/ml, $p < 0.05$ vs. Control), una marcada hiperplasia de las células β del páncreas (0.06 ± 0.01 área de islote/área de páncreas, $p < 0.05$ vs. Control) y un mayor contenido de insulina en los islotes (0.28 ± 0.02 área de tinción positiva/área de islote, $p < 0.05$ vs. Control). El segundo grupo de BATIRKO obeso, el BATIRKO N, mostró normoinsulinemia (0.42 ± 0.05 ng/ml, $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH), un tamaño normal de los islotes (0.02 ± 0.008 área de islote/área de páncreas, ns. vs. Control) y un descenso del contenido de insulina en los islotes (0.14 ± 0.01 área de tinción positiva/área del islote, $p < 0.05$ vs. grupo Control). Adicionalmente, BATIRKO N mostró una intolerancia a la glucosa más acusada y una hiperglucemia en ayunas en comparación con los ratones moderadamente hiperinsulinémicos (Glucemia en ayunas de BATIRKO N = 138 ± 9 mg/dl, $p < 0.05$ vs. Control; glucemia en ayunas de BATIRKO MH = 123 ± 8 mg/dl y del grupo de Control = 111 ± 4 mg/dl) (Figure 5.45).

Table 5.3. Metabolic characterization of BATIRKO HFD model. Comparison table of body weight ratios adipose tissues (BAT and WAT) versus body weight, insulin and glucose levels in Control and BATIRKO mice fed HFD. BATIRKO HFD animals were analyzed in two groups according to their phenotype in BATIRKO MH (BATIRKO with moderate hyperinsulinemia) and BATIRKO N (normoinsulinemic BATIRKO mice). * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH.

The first obese BATIRKO group, BATIRKO MH, showed insulin resistance compensated with moderated hyperinsulinemia. The BATIRKO MH model presented a moderated hyperinsulinemia (1.4 ± 0.2 ng/ml, $p < 0.05$ vs. Control), a noticeable hiperplasia of pancreatic β cells (0.06 ± 0.01 islet area/pancreas area, $p < 0.05$ vs. Control) and a higher insulin content in the islets (0.28 ± 0.02 positive stain area/islet area, $p < 0.05$ vs. Control). The second obese BATIRKO group, BATIRKO N, showed normoinsulinemia (0.42 ± 0.05 ng/ml, $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH), normal islet size (0.02 ± 0.008 islet area/pancreas area, ns. vs. Control) and a drop of the insulin content in islets (0.14 ± 0.01 positive stain area/islet area, $p < 0.05$ vs. Control). In addition, BATIRKO N showed a glucose intolerance more noticeable and a hyperglycemia during the fasting period, in comparison to the moderately hyperinsulinemic mice. (Glycemia in fasting for BATIRKO N = 138 ± 9 mg/dl, $p < 0.05$ vs. Control; glycemia in fasting for BATIRKO MH = 123 ± 8 mg/dl and for the control group = 111 ± 4 mg/dl) (Figure 5.45).

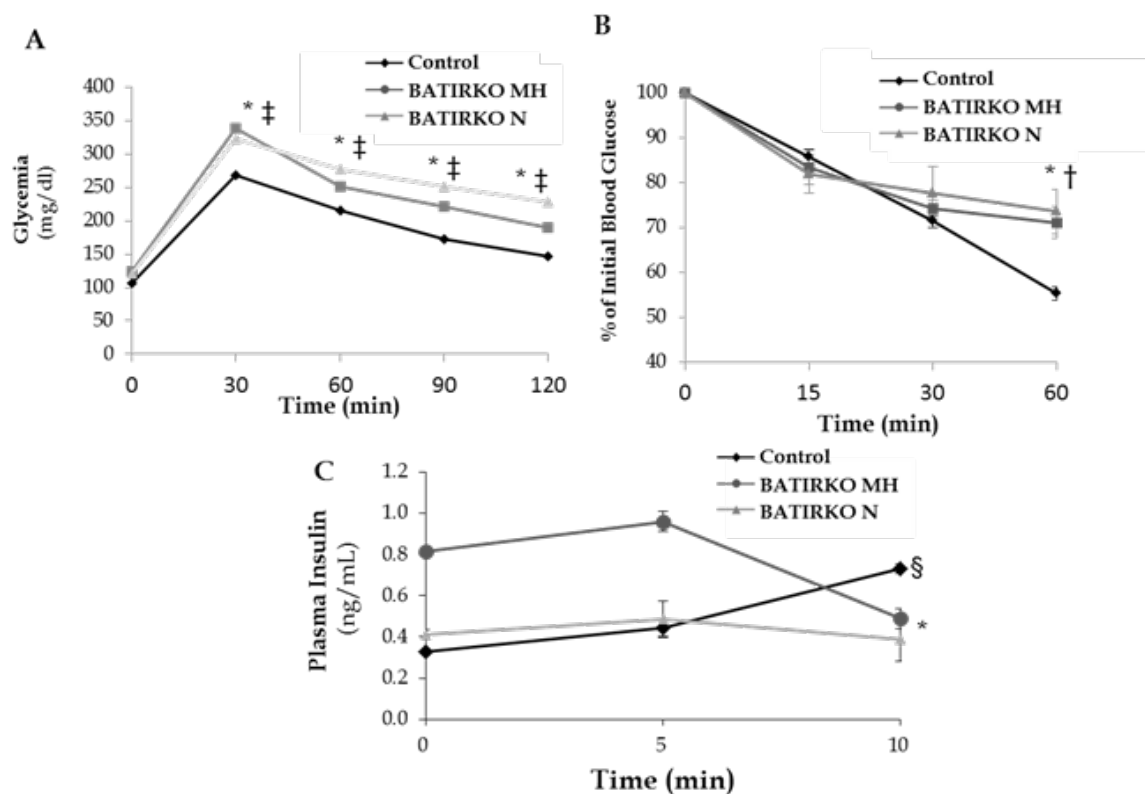


Figura 5.45. Caracterización del modelo animal BATIRKO sometido a dieta grasa. A. Test de tolerancia a la glucosa en los grupos BATIRKO HFD y control HFD. * $p < 0.05$ vs. Control; ‡ $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. B. Test de tolerancia a la insulina en los grupos BATIRKO HFD y control HFD. * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. C. Test de secreción aguda de insulina en los grupos BATIRKO HFD y Control HFD. * $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO N.

Figure 5.45. Characterization of BATIRKO model fed high-fat diet. A. Glucose tolerance test in BATIRKO and control fed HFD. * $p < 0.05$ vs. Control; ‡ $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. B. Insulin tolerance test in BATIRKO and control fed HFD. * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. C. Acute insulin secretion test in BATIRKO and Control mice fed HFD. * $p < 0.05$ vs. Control HFD; § $p < 0.05$ vs. BATIRKO N.

Durante los últimos años, ha quedado claro que la propia insulina además de sus acciones metabólicas, tiene efectos antiaterogénicos en el endotelio y en el músculo liso vascular de la capa media del vaso. Sin embargo, en situaciones patológicas como la obesidad y la diabetes tipo II donde se produce resistencia a la insulina, las acciones vasculares de la insulina también están alteradas. Estas enfermedades que cursan con un gran número de anomalías metabólicas también presentan asociadas complicaciones macrovasculares, como la disfunción vascular y la enfermedad cardiovascular prematura (H. O. Steinberg & Baron 2002; Ohmura et al. 2010). Para profundizar en la

During the last few years, it has become clear that insulin, on top of its metabolic actions, has antiatherogenic effects in the endothelium and in the vascular smooth muscle of the middle layer of the vessel. Nonetheless, in pathological situations such as obesity, type II diabetes in which insulin resistance occurs, insulin vascular actions are altered too. These diseases leads to a high number of metabolic abnormalities, and also they show associated-macrovascular complications, such as vascular dysfunction and premature cardiovascular disease (H. O. Steinberg & Baron 2002; Ohmura et al. 2010). To further investigate in depth the insulin vascular action, we studied the vascular function, analysing the endothelium-de-

acción vascular de la insulina, se estudió la función vascular, analizando la vasorelajación dependiente e independiente de endotelio en aortas torácicas de animales control y BARTIRKO sometidos a dieta grasa (Figura 5.46).

En primer lugar, analizamos la función dependiente de endotelio, como respuesta de vasorelajación inducida por acetilcolina (ACh) en anillos aórticos precontraídos con fenilnefrina (Figura 5.46.A, panel de la izquierda). Los animales BATIRKO MH y sus controles sometidos a HFD, presentaron respuestas de relajación a ACh similares, entre el 60 y 70%. Sin embargo, los ratones obesos BATIRKO N que presentaron un perfil metabólico alterado, mostraron una reducción significativa de la respuesta de vasorelajación inducida por la acetilcolina (~35%). Este descenso en la vasorelajación inducida por ACh, sugiere que los ratones BATIRKO N presentan disfunción endotelial (Figura 5.46.A, panel de la izquierda).

En segundo lugar, evaluamos la función independiente de endotelio por la respuesta de relajación inducida por nitroprusiato sódico (SNP) en anillos precontraídos con fenilnefrina. Se observó que prácticamente el nivel de relajación llegó al 100% a la dosis máxima de SNP en todos los grupos (Figura 5.46.A, panel de la derecha).

Finalmente, estudiamos la respuesta inducida por diferentes agentes vasoconstrictores como el análogo del TXA2 (U46619) y la angiotensina II (Ang II) en los anillos aórticos de todos los grupos de animales (Figura 5.46.B). Se observó que los grupos BATIRKO obeso con normoinsulinemia presentan una mayor respuesta contráctil tanto a U46619 como a Ang II, comparado con el grupo control y el grupo de BATIRKO obeso con hiperinsulinemia moderada (Figura 5.46.B). Estos resultados sugerían que únicamente el grupo de ratones BATIRKO N, que no compensaban la resistencia a la insulina, mostraba disfunción vascular caracterizada por una disfunción endotelial y mayor hipercontractilidad.

pendent and independent vasorelaxation in the thoracic aortas from BATIRKO fed upon high fat diet and control mice (Figure 5.46).

First of all, we analysed the endothelium-dependent function as a response to vasorelaxation induced by acetylcholine (ACh) in aortic rings previously contracted with phenylephrine (Figure 5.46.A, left panel). BATIRKO MH animals and their controls fed upon HFD, presented similar vasorelaxation responses to ACh between 60% and 70%. On the opposite, obese BATIRKO N mice, showing an altered metabolic profile, presented a significant reduction of vasorelaxation response induced by acetylcholine (~35%). This drop in the vasorelaxation induced by ACh, suggests that BATIRKO N mice present endothelial dysfunction (Figure 5.46.A, left panel).

Secondly, we assessed the endothelium-independent function as the relaxation response induced by sodium nitroprusside (SNP) in pre-contracted aortic rings with phenylephrine. We observed that the relaxation level almost reach 100% with the maximum dose of SNP in all the groups (Figure 5.46.A, right panel).

In the long run, we studied the response induced by several vasoconstricting agents such as the TXA2 analogue (U46619) and the angiotensin II (Ang II) in the aortic rings of all the animal groups (Figure 46B). We observed the obese BATIRKO groups with normoinsulinemia showed a greater contractile response, to both U46619 and Ang II, than the control group or the obese BATIRKO group with moderate hyperinsulinemia (Figure 5.46B). These results suggest only the BATIRKO N mice, which do not compensate insulin resistance, showed a vascular dysfunction, characterized by an endothelial dysfunction and a greater hypercontractility.

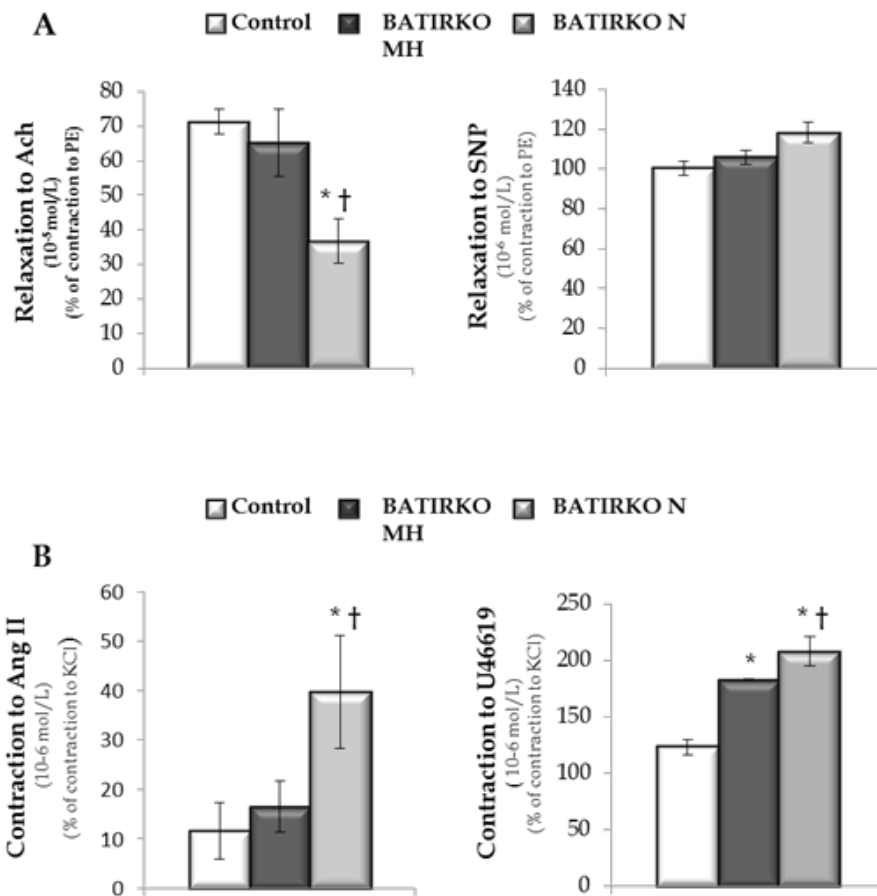


Figura 5.46. Estudio de la función vascular en aortas de ratones control y BATIRKO obesos. A. Estudio de la vasorelajación en respuesta a ACh (gráfico de la izquierda) o a SNP (gráfico de la derecha) en anillos aórticos precontraídos con fenilnefrina (PE) de ratones Control y BATIRKO sometidos a dieta grasa. B. Estudio de la respuesta contráctil inducida por angiotensina II (gráfico de la izquierda) o por el análogo del TXA2 (U46619) (gráfico de la derecha) en anillos aórticos de ratones Control y BATIRKO sometidos a dieta grasa. * $p < 0.05$ vs. Control HFD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH; BATIRKO MH, BATIRKO obesos moderadamente hiperinsulinémicos; BATIRKO N, BATIRKO obesos normoinsulinémicos.

Figure 5.46. Study vascular function in aortas from Control mice and obese BATIRKO mice. A. Study of vasorelaxation in response to ACh (left graph) or SNP (right chart) in aortic rings precontracted fenilnefrina (PE) of the control mice and subjected to BATIRKO fat diet. B. Study of the contractile response induced by angiotensin II (left graph) or the TXA2 analogue (U46619) (right graph) in aortic rings and BATIRKO Control mice under high-fat diet. * $p < 0.05$ vs. HFD Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH; BATIRKO MH, moderately hyperinsulinemic obese BATIRKO mice; BATIRKO N, normoinsulinemic obese BATIRKO mice.

Como parámetros de daño vascular se estudiaron la acumulación de lípidos, el infiltrado de macrófagos y el área de lesión en los arcos aórticos de los animales control y los dos subgrupos de BATIRKO HFD (BATIRKO N y MH). Se encontró un aumento estadísticamente significativo del contenido lipídico, del área de lesión y del infiltrado de macrófagos en el arco aórtico de los ratones BATIRKO N, que

As vascular damage parameters, we studied lipid accumulation, macrophage infiltration and the lesion area in aortic roots for the controls groups and the two BATIRKO HFD subgroups (BATIRKO N y MH). We observed a statistically significant increase of the lipid content, the lesion area and the macrophage infiltration in the aortic roots from BATIRKO N mice, which do not compensate insulin resistance, compared to the results observed with the BATIRKO MH, which present a mo-

no compensan la resistencia a la insulina, en relación con el BATIRKO MH, que presenta una moderada compensación (Figura 5.47).

derate compensation against insulin resistance (Figure 5.47).

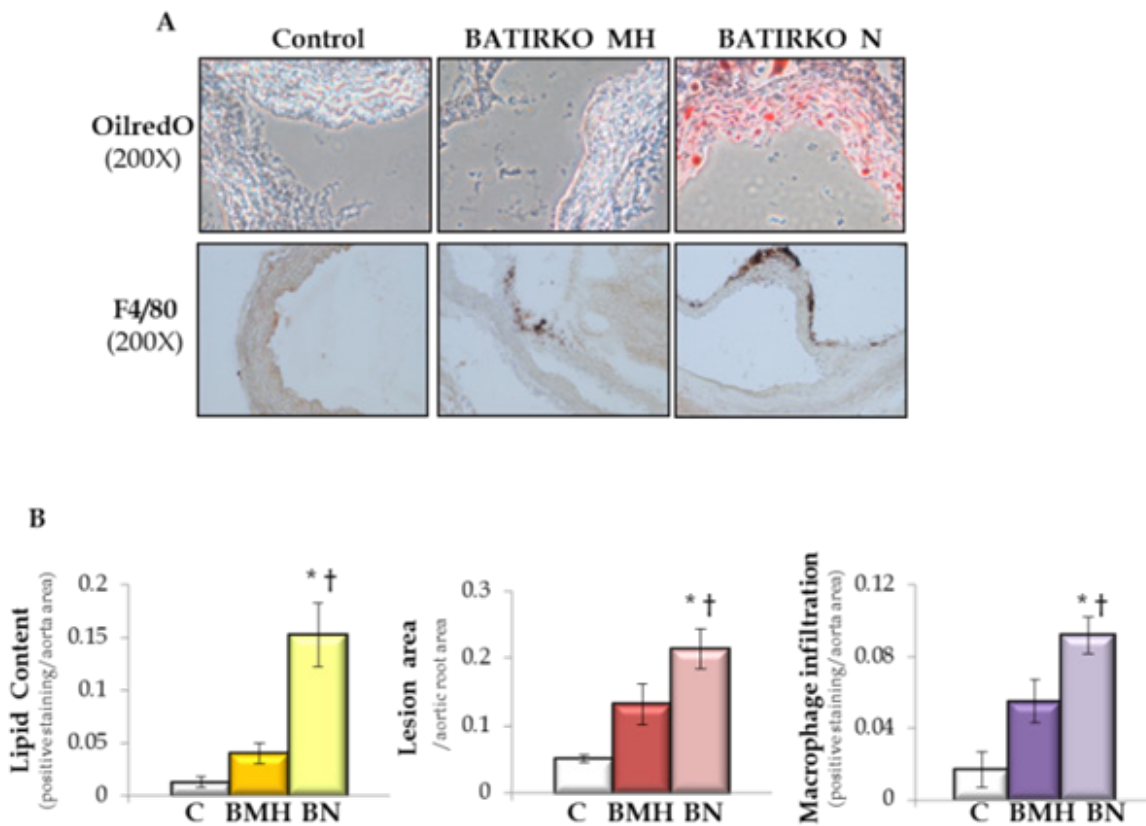


Figura 5.47. Análisis morfométrico de los arcos aórticos de ratones BATIRKO sometidos a dieta grasa. A. Acumulación lipídica por tinción con Oil-Red (paneles superiores), e infiltrado de macrófagos mediante inmunohistoquímica frente al anti-F4/80 (paneles inferiores) en los arcos aórticos de ratones Control, BATIRKO MH y BATIRKO N. B. Cuantificación del contenido lipídico, área de lesión e infiltrado de macrófagos en los arcos aórticos de los tres grupos de animales estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control HFD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH.

Figure 5.47. Morphometric analysis of aortic roots from BATIRKO mice fed high-fat diet. A. lipid accumulation by Oil-Red staining (upper panels), and macrophage infiltration by immunohistochemistry against anti-F4/80 (lower panels) in the aortic roots from Control, BATIRKO MH and BATIRKO N mice. B. Quantification of lipid content, lesion area and macrophage infiltration in the aortic roots from from studied three animal groups. * $p < 0.05$ vs. Control HFD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH.

Posteriormente, analizamos los niveles del mRNA para UCP-2 en la aorta de los animales Control y BATIRKO HFD por qRT-PCR. Ésto nos permitió relacionar dichos niveles de UCP-2 con la acumulación de lípidos en los arcos aórticos de animales BATIRKO HFD y sus controles. Se observó que los ratones BATIRKO MH mostraron un aumento significativo de los niveles de expresión de UCP-2, en comparación con los BATIRKO N y los Controles (Figura 5.48). Este hecho les puede

Subsequently, we analysed UCP-2 mRNA expression in the aortas from control and BATIRKO HFD mice by qRT-PCR. It allowed us to connect these UCP-2 levels with the lipid accumulation in the aortas from BATIRKO HFD animals and their controls. We observed the BATIRKO MH mice showed a significant increase in UCP-2 expression levels, compared to the BATIRKO N and the controls (Figure 5.48). This fact may protect them against vascular alterations. Nonetheless, BATIRKO

proteger frente a las alteraciones vasculares. Sin embargo, los animales BATIRKO N que presentaron disfunción endotelial y otras alteraciones vasculares (Figura 5.46 y 5.47) tenían bajos niveles de UCP-2 en la aorta, en comparación con los animales BATIRKO MH (Figura 5.48.A). Además, en la Figura 47B se puede observar una correlación negativa y significativa entre los niveles de UCP-2 y la acumulación lipídica en la arteria aorta de los distintos grupos como previamente habíamos visto para el modelo ApoE-/-.

N animals that showed endothelial dysfunction and other vascular alterations (Figure 5.46 and 5.47) have low UCP-2 levels in the aorta, in comparison to BATIRKO MH animals (Figure 5.48.A). In addition, in Figure 48B, it can be observed a negative and significant correlation between UCP-2 levels and lipid accumulation in the aortic artery of each distinct group as previously observed with the ApoE-/- model.

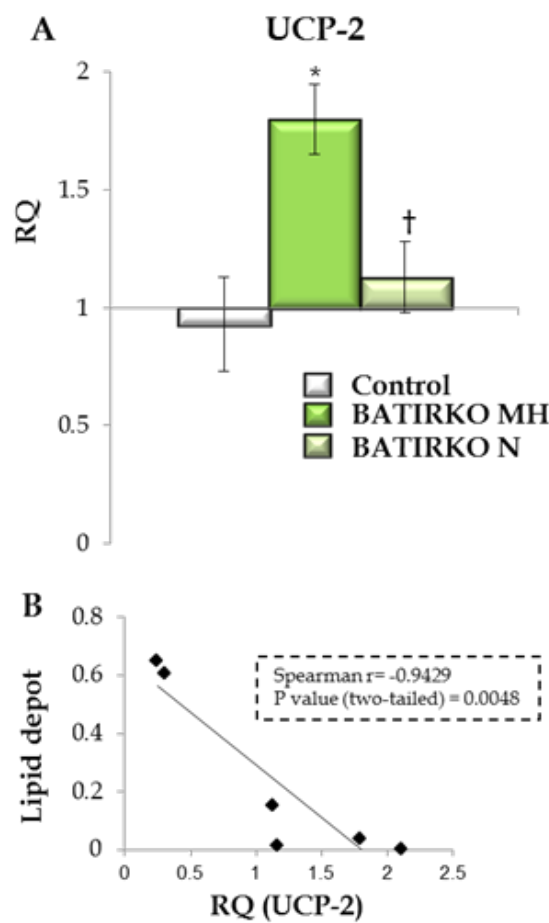


Figura 5.48. Niveles del mRNA de UCP-2 y correlación entre los niveles de UCP-2 y la acumulación lipídica en la aorta de los grupos Control, BATIRKO MH y BATIRKO N. A. Expresión de UCP-2 por qRT-PCR en la arteria aorta de los tres grupos sometidos a dieta grasa. * $p < 0.05$ vs. Control HFD; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. B. Correlación de Spearman negativa entre los niveles de UCP-2 y la acumulación lipídica en los arcos aórticos de los tres grupos sometidos a dieta grasa.

Figure 5.48. UCP-2 mRNA levels and correlation between it and lipid accumulation in the aorta of the Control, BATIRKO MH and BATIRKO N groups. A. UCP-2 expression by qRT-PCR in the aorta artery from the three groups under high fat diet. * $p < 0.05$ vs. HFD Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. B. Spearman negative correlation graphic between the levels of UCP-2 and lipid accumulation in the aortic roots of the three groups under high-fat diet.

Además, analizamos y cuantificamos la expresión proteica de UCP-2 en los tres grupos sometidos a dieta grasa por Western blot. En concordancia con los resultados anteriores, se observó que los BATIRKO MH que tenían mayor expresión del mRNA de UCP-2, también presentaron niveles proteicos mayores de UCP-2 (Figura 5.49). Es importante recordar que este grupo de animales presentó un perfil de daño vascular mucho más leve que el animal BATIRKO N. En contraste, el animal BATIRKO normoinsulinémico presentó niveles más bajos de la expresión proteica de UCP-2 en relación a los controles y principalmente al grupo de BATIRKO moderadamente hiperinsulinémico. Estos resultados son coherentes con los hallazgos obtenidos en el animal ApoE^{-/-} de 24 semanas (Figura 5.44).

On top of that, we analysed and quantified the UCP-2 protein expression in the three groups fed upon high fat diet through Western blot. Consistently with the previous results, we observed that BATIRKO MH, which had greater UCP-2 mRNA expression, present higher UCP-2 protein levels too (Figure 5.49). It is important to remember that this animal group showed a profile of vascular damage so much lighter than for BATIRKO N. In contrast, the normoinsulinemic BATIRKO animal showed the lowest levels of UCP-2 protein expression compared to the controls and in particular to the BATIRKO group moderately hyperinsulinemic. These results are consistent with the findings obtained with the 24-week-old ApoE^{-/-} animal (Figure 5.44).

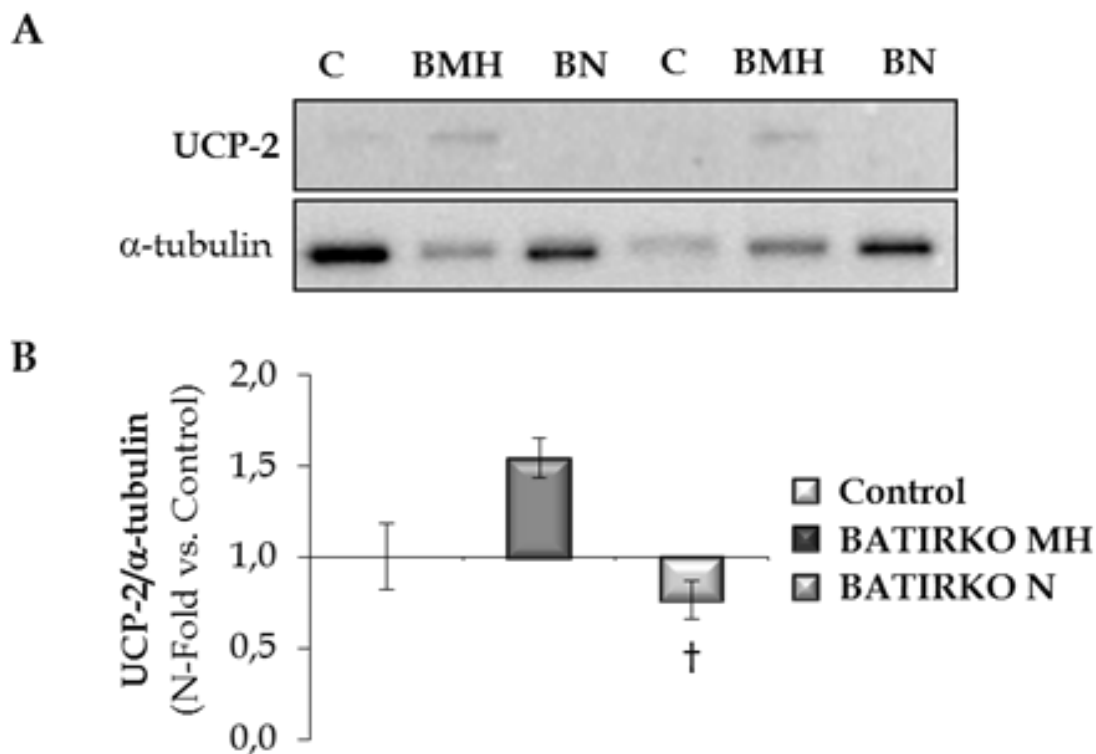


Figura 5.49. Niveles proteicos de UCP-2 en los animales Controles y BATIRKO sometidos a dieta grasa. Mediante Western blot se analizó y cuantificó la expresión de la proteína UCP-2 en las arterias aortas de ratones Control, BATIRKO MH y BATIRKO N. Se normalizó frente al nivel endógeno de α -tubulina. † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH.

Figure 5.49. UCP-2 protein levels in Controls and BATIRKO mice subjected to high-fat diet. By Western blot, UCP-2 protein levels in aortas arteries from Control, BATIRKO MH and BATIRKO N mice was analyzed and quantified. They were normalized against endogenous α -tubulin level. † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH.

5.2.3. Relación entre la expresión de TNF- α y UCP-2 in vivo

En la literatura se ha descrito, que el TNF- α podría directamente regular a la baja la expresión de UCP-2 en los adipocitos blancos (Merial et al. 2000). Previamente, nosotros hemos demostrado in vitro, que el TNF- α regula de forma negativa los niveles proteicos de UCP-2 en VSMCs y ECs. Además, in vivo, hemos observado que las dos poblaciones de animales BATIRKO HFD presentaron distintos niveles de expresión de UCP-2. Por lo cual, nos planteamos que la expresión diferencial de TNF- α en el tejido adiposo blanco y la aorta podría ser uno de los mecanismos implicados en la expresión diferencial de UCP-2 en la aorta de las dos poblaciones de BATIRKO obesos.

Analizamos los niveles circulantes de TNF- α en el grupo Control y en las dos poblaciones de BATIRKO obesos. Asimismo, se cuantificó la expresión del mRNA del TNF- α en WAT y aorta, puesto que estos animales presentan obesidad y alteraciones vasculares. Se observó que los ratones BATIRKO N, que presentaron niveles bajos de UCP-2 en la aorta y mayor daño vascular (Figura 5.48 y 5.49), presentaban un aumento significativo en los niveles de TNF- α plasmáticos, en el WAT y en la aorta en comparación con los ratones BATIRKO MH (Figura 5.50.A). Por otro lado, el grupo de ratones obesos con hiperinsulinemia moderada, presentó bajos niveles de TNF- α tanto en el plasma como en la aorta (Figura 5.50.A). Además, se encontró una correlación negativa y significativa entre los niveles de expresión del mRNA de TNF- α y UCP-2 en la arteria aorta de ambos grupos de BATIRKO obesos (Figura 5.50.C). Asimismo, valoramos si esos valores diferenciales de TNF- α a nivel sistémico y local, en el propio WAT, podrían afectar de forma también diferencial a la señalización in vivo de la insulina. Para ello, se valoró la fosforilación de AKT (Ser 473) en el WAT de ratones Control, BATIRKO MH y BATIRKO

5.2.3. Relation between TNF- α and UCP-2 in vivo

In the literature, it has been described that TNF- α may directly down-regulate expression of UCP-2 in white adipocytes (Merial et al. 2000). Previously, we demonstrated, in vitro, that TNF- α down-regulates UCP-2 protein levels in VSMCs and ECs. In addition, in vivo, we have observed that both populations of BATIRKO HFD animals presented differential UCP-2 expression levels. For that reason, we contemplated the possibility that the differential expression of TNF- α in white adipose tissue and in the aorta may be one of the mechanisms involved in the differential expression of UCP-2 in the aorta from both obese BATIRKO populations.

We analysed the circulating levels of TNF- α in the control group and in the two obese BATIRKO populations. In this way, TNF- α mRNA expression was quantified in WAT and the aorta, given that these animals showed obesity and vascular damage. We observed that BATIRKO N mice, which presented low levels of UCP-2 in aorta and greater vascular damage (Figure 5.48 and 5.49), showed a significant increase of the levels of TNF- α in plasma, WAT, and in the aorta compared to the BATIRKO MN mice (Figure 49A). On the other hand, the obese mice group with moderate hyperinsulinemia presented low levels of TNF- α in plasma as well as in the aorta (Figure 5.50.A). In addition, a negative and significant correlation between TNF- α and UCP-2 mRNA expression in the aorta from both obese BATIRKO groups (Figure 5.50.C). Then, we evaluated if those differential TNF- α values on systemic and local level in WAT, may affect, as well in a differential way, insulin signalling in vivo. In order to assess it, AKT phosphorylation (Ser 473) in WAT from BATIRKO MH, BATIRKO N and controls mice was measured. We observed that BATIRKO N animals with greater circulating TNF- α levels and higher TNF- α levels in WAT, did not respond

N. Se encontró que los animales BATIRKO N con mayores niveles de TNF- α circulantes y en el WAT, no respondieron a la estimulación con insulina exógena. Sin embargo, los ratones BATIRKO MH con niveles normales de TNF- α circulantes no mostraron afectada la señalización de insulina en el tejido adiposo blanco (Figura 5.50.B).

to exogenous insulin stimulation. However, for the BATIRKO MH mice, with normal levels of circulating TNF- α , insulin signalling in white adipose tissue was not affected (Figure 5.50.B).

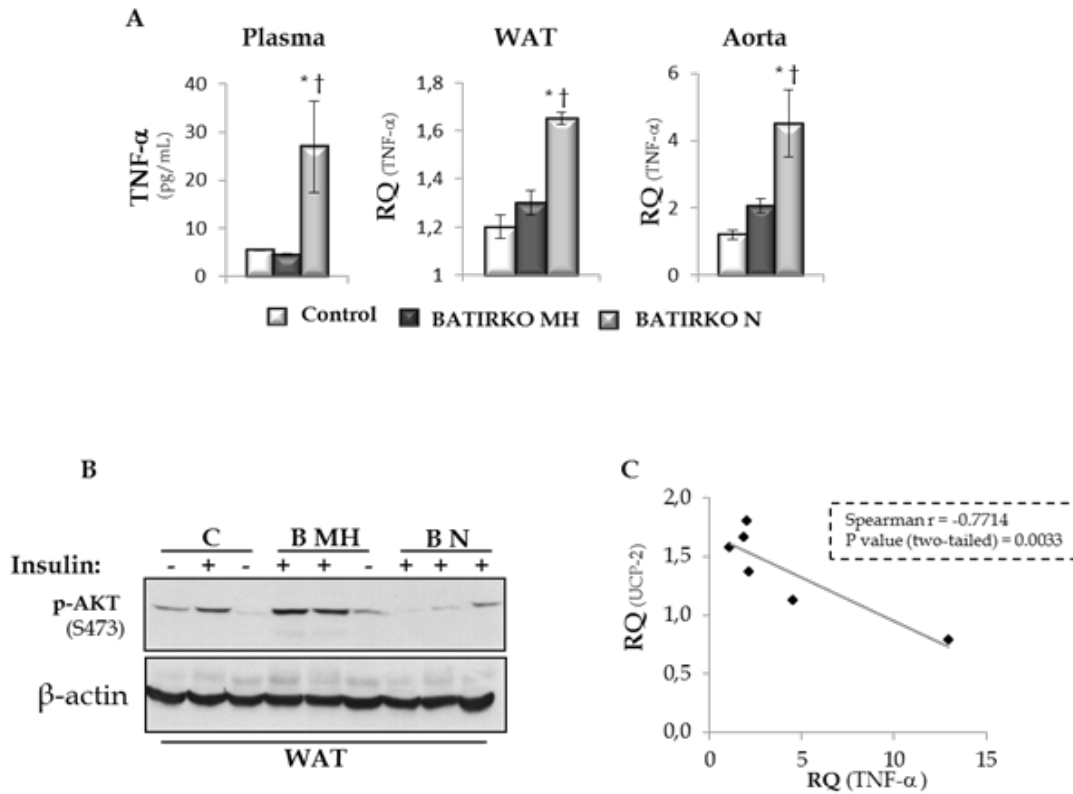


Figura 5.50. Efecto in vivo del TNF- α en la expresión de UCP-2 y en la resistencia a la insulina. A. Determinación de los niveles de TNF- α plasmáticos por ELISA, y niveles de la expresión del mRNA de TNF- α en WAT y la aorta por qRT-PCR. * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. **B.** Análisis mediante Western blot de la fosforilación de AKT (S473) inducida por insulina en tejido adiposo blanco de animales Control y BATIRKO HFD. **C.** Correlación de Spearman entre los niveles UCP-2 y TNF- α en la arteria aorta de los 3 grupos de animales sometidos a dieta grasa.

Figure 5.50. Effect in vivo of TNF- α in UCP-2 expression and insulin resistance. A. Determination of plasma TNF- α levels by ELISA, and TNF- α mRNA expression in WAT and the aorta by qRT-PCR. * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. **B.** Western blot analysis of AKT (S473) phosphorylation induced by insulin in white adipose tissue from BATIRKO and Control mice fed HFD. **C.** Spearman correlation between UCP-2 and TNF- α levels in the aorta of the 3 groups of animals under HFD.

Anteriormente, analizamos la expresión de los niveles de UCP-2 en la aorta y los niveles circulantes de TNF- α en los animales control y en ambos grupos de BATIRKO de 33 semanas de edad bajo HFD durante 16 semanas. Nosotros encontramos la existencia de una correlación negativa y significativa entre los

Previously, we analysed UCP-2 expression levels in the aorta and circulating TNF- α levels, in the control animals and in both 33-week-old BATIRKO groups fed upon HFD for 16 weeks. We found a negative and significant correlation existed between TNF- α and UCP-2 levels in the aortic arteria (Figure 5.50).

niveles de TNF- α y UCP-2 en la arteria aorta (Figura 5.50).

Para continuar con el estudio de la correlación de los niveles de TNF- α y UCP-2 in vivo, utilizamos el modelo BATIRKO de 52 semanas de edad (BATIRKO 52w) bajo dieta estándar (STD). Se utilizaron animales tipo silvestre de 33 y 52 semanas bajo STD como Controles.

Elegimos trabajar con el modelo BATIRKO 52w puesto que presenta obesidad asociada a la edad, lipoatrofia severa marrón, hipoinsulinemia, hiperglucemia en ayunas, e intolerancia a la glucosa, sin resistencia global a la insulina. Además, estos animales presentaron disfunción vascular, infiltración de macrófagos, estrés oxidativo en los arcos aórticos, y aumento estadísticamente significativo de la concentración de leptina y TNF- α circulantes (Gómez-Hernández, A. et al. 2012). Todas estas características convierten a BATIRKO 52w en un modelo in vivo complementario para el estudio de la correlación de los niveles de TNF- α y UCP-2 con el daño vascular.

Estudiamos los mecanismos del daño vascular en el modelo BATIRKO 52w, y la relación con los niveles de expresión de UCP-2 y los niveles circulantes de TNF- α (Figura 5.51). Se observó que BATIRKO de 52 semanas presentó una reducción significativa de los niveles de expresión del mRNA de UCP-2 en la aorta en comparación con los controles de 33 y 52 semanas. En contraposición, el tratamiento con anti-TNF- α evitaría una regulación a la baja de los niveles de UCP-2 en la aorta de animales BATIRKO 52w (Figura 5.51.A).

El animal BATIRKO 52w presenta una disminución significativa de UCP-2 en la aorta y mayores niveles circulantes de TNF- α en comparación con los grupos control de 33 y 52 semanas (Figura 51A y B). Se estableció una correlación negativa y estadísticamente significativa entre los niveles de mRNA de UCP-2 en la aorta y los niveles circulantes de TNF- α en los cuatro grupos de animales estudiados (Figura 51C).

In order to keep on studying TNF- α and UCP-2 correlation in vivo, we used the 52-week-old BATIRKO model (BATIRKO 52w) fed upon standard diet (STD). 33-week-old and 52-week-old wild type animals fed upon STD were used as Controls.

We chose to work with the BATIRKO 52w model as it presents age-associated obesity, severe brown lipoatrophy, hypoinsulinemia, hyperinsulinemia in fasting and glucose intolerance without global insulin resistance. On top of that, these animals showed vascular dysfunction, macrophage infiltration, oxidative stress in aortic roots and a statistically significant increase of leptin and circulating TNF- α concentration (Gómez-Hernández, A. et al. 2012). All these characteristics convert the BATIRKO 52w into an in vivo complementary model in the study of a correlation between the levels of TNF- α and UCP-2 and vascular damage.

We studied the vascular damage mechanisms in the BATIRKO 52w model and its relationship with the levels of circulating TNF- α and UCP-2 expression (Figure 5.51). We observed the 52-week-old BATIRKO mice showed a significant reduction of UCP-2 mRNA expression levels in the aorta compared to the 33- and 52-week-old controls. In contrast, the treatment with anti-TNF- α avoided a down-regulation of UCP-2 levels in the aorta from 52-week-old BATIRKO mice (Figure 5.51.A).

52-week-old BATIRKO mice presented a significant decrease of UCP-2 in the aorta and higher levels of circulating TNF- α in comparison to the 33- and 52-week-old control groups (Figure 5.51.A and B). A negative and statistically significant correlation was established between UCP-2 mRNA levels in the aorta and the levels of circulating TNF- α from the four studied groups (Figure 5.51.C).

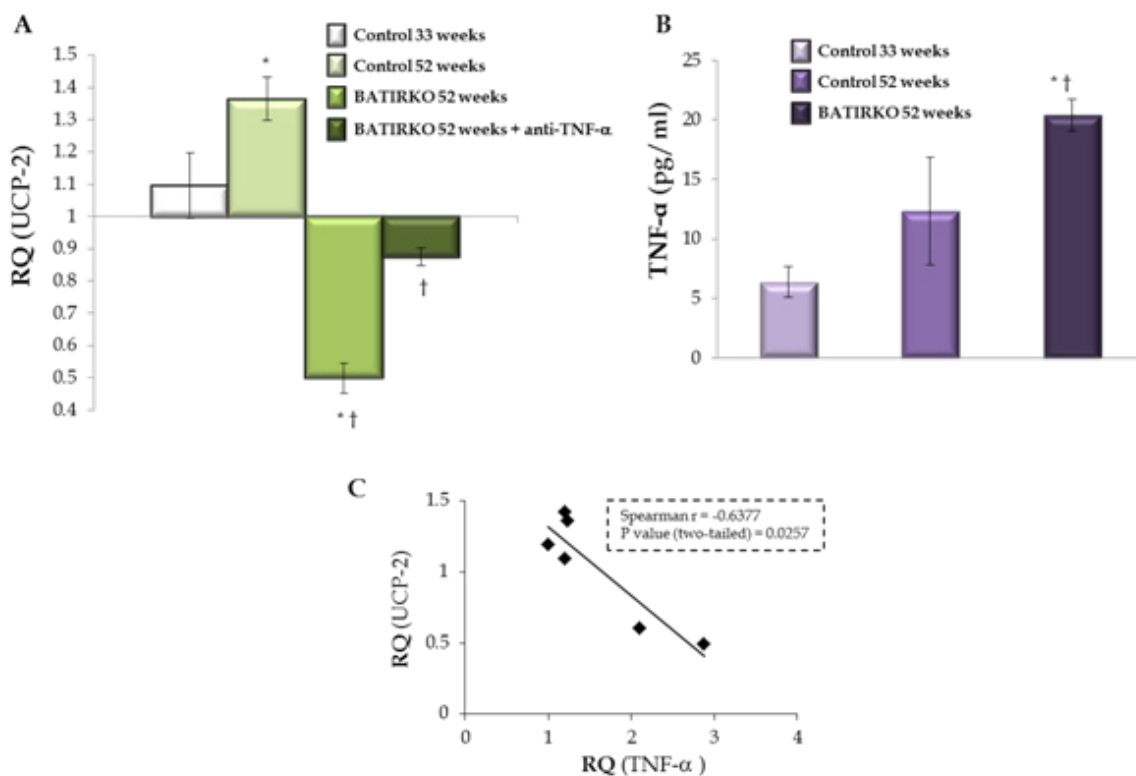


Figura 5.51. Niveles de expresión de UCP-2 en el modelo BATIRKO de 52 semanas. **A.** Análisis de la expresión de UCP-2 en la aorta de ratones Control, BATIRKO y BATIRKO de 52 semanas de edad tratados con anti-TNF- α mediante qRT-PCR. **B.** Niveles circulantes de TNF- α en ratones control y BATIRKO de 52 semanas. **C.** Correlación de Spearman entre los niveles de expresión UCP-2 y de TNF- α en la aorta de los cuatro grupos de animales estudiados. * $p < 0.05$ vs. Control de 33 semanas; † $p < 0.05$ vs. Control de 52 semanas.

Figure 5.51. UCP-2 expression levels in the BATIRKO model at 52 weeks of age. **A.** Analysis of UCP-2 expression in the aorta from 52-week-old Control mice, BATIRKO mice and BATIRKO mice treated with anti-TNF- α by qRT-PCR. **B.** Circulating TNF- α levels in control mice and BATIRKO mice at 52 weeks of age. **C.** Spearman correlation between UCP-2 and TNF- α mRNA expression in the aorta from the four groups of animals studied. * $p < 0.05$ vs. 33-wk-old Control mice; † $p < 0.05$ vs. 52-wk-old Control mice.

Adicionalmente, analizamos y cuantificamos la expresión proteica de UCP-2 en los animales BATIRKO de 52 semanas por Western blot. Se observó que BATIRKO de 52w presentó una reducción significativa de la expresión proteica de UCP-2 en la aorta en comparación con sus Controles de 52 semanas (Figura 5.52.A). Cuando los niveles proteicos fueron comparados con el grupo BATIRKO de 52 semanas tratados con anti-TNF- α , se observó que este tratamiento permitió recuperar la expresión proteica de UCP-2 (Figura 5.52.B).

In addition, we analysed and quantified UCP-2 protein expression in 52-week-old BATIRKO mice by Western blot. We observed that BATIRKO 52w presented a significant reduction of UCP-2 protein expression in the aorta compared to the 52-week-old Control mice (Figure 5.52.A). When the protein levels were compared to the 52-week-old BATIRKO group treated with anti-TNF- α , we observed this treatment allowed to recover UCP-2 protein expression (Figure 5.52.B).

Estos resultados nos indican que el TNF- α está implicado directamente en las alteraciones vasculares descritas en BATIRKO de 52 se-

These results show that TNF- α is directly involved in the vascular alterations described in the 52-week-old BATIRKO mice by a down-regulation of UCP-2 expression. On

manas, mediante una regulación a la baja de la expresión de UCP-2. Además, este hecho está apoyado porque el grupo de animales BATIRKO tratados con anti-TNF- α normalizaban los niveles de UCP-2 en la aorta, mejorando las alteraciones vasculares y disminuyendo la expresión de marcadores inflamatorios en la aorta (Figura 5.52 y 5.26).

top of that, this fact is supported by the fact the BATIRKO group treated with anti-TNF- α normalized the UCP-2 levels in the aorta, thus improving vascular alterations and reducing the expression of the inflammatory markers in the aorta (Figure 5.52 and 5.27).

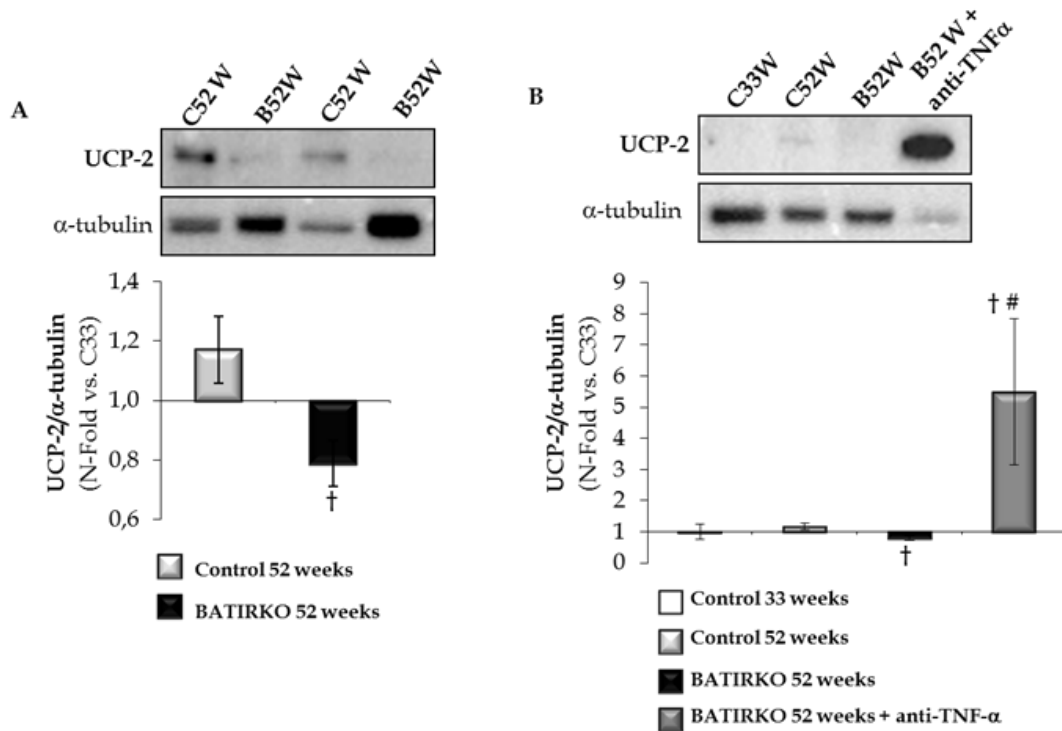


Figura 5.52. Niveles de proteína de UCP-2 en la arterias aortas del modelo BATIRKO de 52 semanas. Análisis por Western blot de la expresión de la proteína UCP-2 en las arterias aortas de ratones Control de 33 semanas (B), Controles de 52 semanas (A y B), BATIRKO de 52 semanas (A y B), y BATIRKO de 52 semanas tratados con anti-TNF- α (B). Se normalizó frente al nivel endógeno de α -tubulina. † $p < 0.05$ vs. Control 52w; # $p < 0.05$ vs. BATIRKO 52w.

Figure 5.52. UCP-2 protein levels in the aorta arteries from 52-week-old BATIRKO mice. Western blot analysis of UCP-2 protein levels in aorta arteries from 33-week-old Control mice (B), 52-week-old Control mice (A and B), 52-week-old BATIRKO mice (A and B), and 52-week-old BATIRKO mice treated with anti-TNF- α (B). It was normalized against the endogenous level of α -tubulin. † $p < 0.05$ vs. Control 52w; # $p < 0.05$ vs. BATIRKO 52w.

5.2.4. Efecto de la insulina sobre la expresión de UCP-2 in vivo

In vitro se estableció una relación entre los niveles de UCP-2 y la insulina, donde esta última inducía la sobreexpresión de UCP-2 en ambas líneas vasculares (Figura 5.40). Para conocer si esta misma relación se presentaba in vivo, relacionamos los niveles de insulina circulantes de los animales BATIRKO HFD con los niveles de UCP-2 en la aorta. Se observó que el BATIRKO obeso con moderada hiperinsulinemia presentó altos niveles de UCP-2 y menos daño vascular en comparación con el animal BATIRKO obeso que no compensa la resistencia a la insulina (BATIRKO N). Por ello, pudimos establecer una correlación positiva y significativa entre los niveles de insulina circulante y los niveles de UCP-2 en la aorta (Figura 5.53).

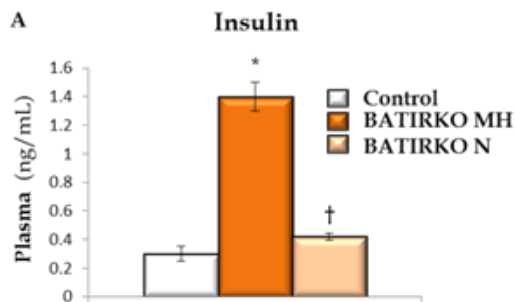


Figura 5.53. Correlación in vivo entre los niveles circulantes de insulina y los niveles de UCP-2 en la aorta del modelo BATIRKO sometido a dieta grasa. A. Niveles de insulina circulantes medidos por ELISA en los animales Control y BATIRKO HFD. * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. B. Correlación de Spearman entre los niveles de expresión UCP-2 en la aorta con los niveles de insulina en el plasma.

La relación entre los niveles de UCP-2 y la insulina, establecida anteriormente in vivo, se confirmó en un segundo modelo animal, el BATIRKO de 52 semanas de edad bajo dieta STD. En este modelo, el grupo Control de 52 semanas que presentaba una ligera hiperinsulinemia asociada al envejecimiento con respecto

5.2.4 Insulin effect on UCP-2 expression in vivo

In vitro, a relationship was established between UCP-2 levels and insulin in which insulin induced UCP-2 overexpression in both vascular lines (Figure 5.40). With the aim of investigating if the same relationship existed in vivo, we looked for relation of the insulin circulating levels in BATIRKO HFD animals with the levels of UCP-2 in the aorta. We observed that the obese BATIRKO with moderate hyperinsulinemia presented high levels of UCP-2 and less vascular damage in comparison to the obese BATIRKO animal that do not compensate insulin resistance (BATIRKO N). For it, we could establish a positive and significant correlation between the levels of circulating insulin and the levels of UCP-2 in the aorta (Figure 5.53).

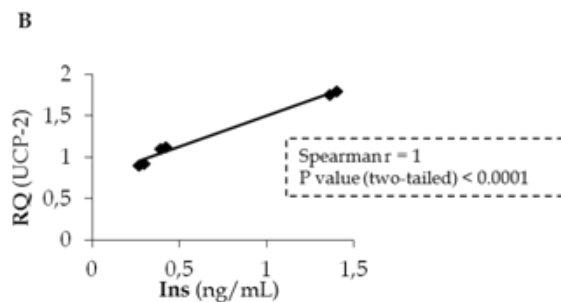


Figure 5.53. In vivo correlation between circulating insulin levels and levels of UCP-2 in the model BATIRKO aorta under high-fat diet. A. Circulating insulin levels measured by ELISA in Control and BATIRKO mice under HFD. * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH. B. Spearman correlation between UCP-2 expression levels in the aorta with insulin levels in plasma.

The relationship between the levels of UCP-2 and insulin, previously established in vivo, was confirmed in a second animal model, 52-week-old BATIRKO mice fed upon STD diet. In this model, 52-week-old control group, which showed a light age-associated hyperinsulinemia, when compared to 33-week-old control mice (Figure 5.54.A), showed a slightly increa-

a los Controles de 33 semanas (Figura 5.54.A) mostró niveles ligeramente aumentados de UCP-2 en la aorta (Figura 5.51.A y 5.52.B). A su vez, el ratón BATIRKO de 52 semanas que tenía hipoinsulinemia con respecto al control de su misma edad (Figura 54A) tenía un descenso significativo de la expresión de UCP-2 en la aorta (Figura 51A y 52). Así, pudimos confirmar la correlación *in vivo* positiva y significativa entre los niveles de expresión de UCP-2 en la aorta y los niveles circulantes de insulina (Figura 5.54).

sed UCP-2 levels in the aorta (Figure 5.51.A and 5.52.B). In the meantime, 52-week-old BATIRKO mice with hypoinsulinemia in comparison to their corresponding control at the same age (Figure 5.54.A), showed a significant drop of the UCP-2 expression in the aorta (Figure 51A and 52). Thus, we could confirm, *in vivo*, the positive correlation between the expression levels of UCP-2 in the aorta and the levels of circulating insulin (Figure 5.54).

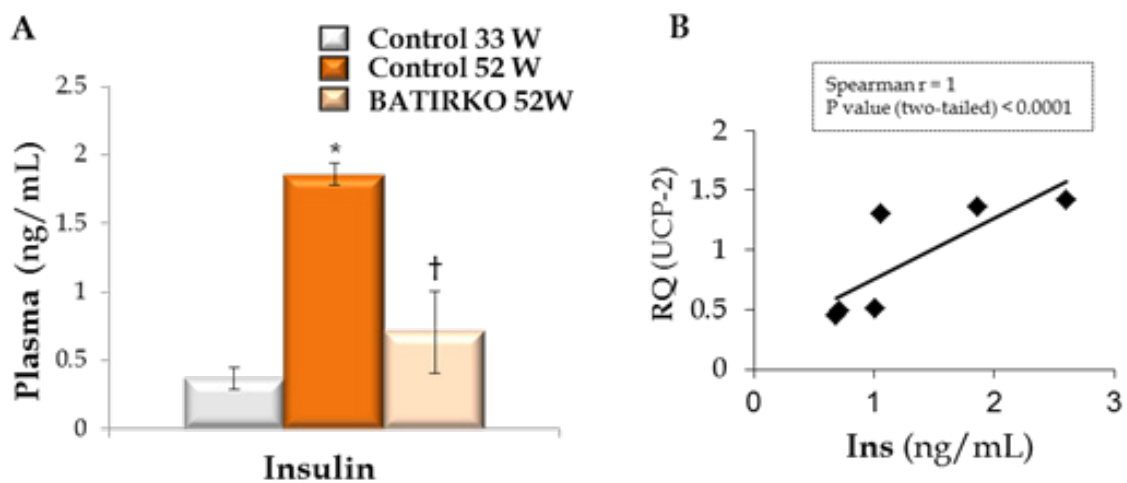


Figura 5.54. Correlación *in vivo* entre los niveles de insulina circulantes y los niveles de UCP-2 en la aorta del modelo BATIRKO de 52 semanas de edad. A. Niveles de insulina circulantes en los animales Control y BATIRKO de 52 semanas medidos mediante kits de ELISA. * $p < 0.05$ vs. Control 33w; † $p < 0.05$ vs. Control 52w. B. Correlación de Spearman entre los niveles de expresión de UCP-2 en la aorta con los niveles de insulina en plasma.

Figure 5.54. *In vivo* correlation between insulin circulating levels and UCP-2 mRNA levels in aorta from 52-week-old BATIRKO mice. A. Circulating insulin levels in the control mice and 52-week-old BATIRKO mice measured by ELISA kits. * $p < 0.05$ vs. Control 33w; † $p < 0.05$ vs. Control 52w. B. Spearman correlation between the expression of UCP-2 levels in the aorta with plasma insulin levels.

5.2.5. Papel protector de UCP-2 frente al estrés oxidativo de la pared vascular

Los radicales libres incluyendo especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) se generan por diferentes condiciones fisicoquímicas o estados patológicos. En las células vasculares, la producción de ROS y RNS está implicada en mecanismos patogénicos subyacentes a la progresión de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo enfermedad cardíaca isquémica, aterosclerosis, arritmia cardíaca, hipertensión y diabetes (Singh et al. 2014). Además, la hiperglucemia persistente aumenta el estrés oxidativo celular y sistémico, provocando la aparición de disfunción endotelial vascular y la aterosclerosis (Liu L. et al. 2014). Por otra parte, algunos autores han planteado que una sobreexpresión de UCP-2 podría modificar el proceso aterosclerótico debido al hecho de que niveles elevados de esta proteína reducen los niveles de ROS (Kim et al. 2007).

En este contexto, estudiamos la producción de RNS y ROS, por inmunohistoquímica y DHE respectivamente, en los arcos aórticos de ratones Control y BATIRKO sometidos a dieta grasa. Se cuantificó la producción de nitrotirosina y anión superóxido en los arcos aórticos por la intensidad de la tinción sobre el área total de la aorta. Se observó una disminución significativa del anión superóxido y los niveles de nitrotirosina en las raíces aórticas de BATIRKO MH en comparación con los ratones obesos BATIRKO N. Es importante recordar que este animal BATIRKO MH presentó mayores niveles de UCP-2, que podrían disminuir la producción tanto de ROS como de RNS y proteger frente al daño vascular. Sin embargo, el grupo BATIRKO N con niveles de UCP-2 significativamente disminuidos, era el que presentaba mayores niveles de anión superóxido y de nitrotirosina en los arcos aórticos y mayor daño vascular (Figura 5.55).

5.2.5 Protector role of UCP-2 against the oxidative stress in the vascular wall

Free radicals including reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are generated by various physiochemical conditions or pathological states. In vascular cells, ROS and RNS production is involved in pathogenic mechanisms underlying the progression of cardiovascular diseases including ischemic heart disease, atherosclerosis, heart arrhythmia, hypertension and diabetes (Singh et al. 2014).

In addition, persistent hyperglycemia increases the cellular and systemic oxidative stress, causing the appearance of vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis

(Liu et al. 2014). On the other hand, some authors set out an overexpression of UCP-2 may modify the atherosclerotic process as high levels of UCP-2 may reduce the levels of ROS.

In this context, we respectively studied RNS and ROS production by immunohistochemistry and DHE, in the aortic roots from BATIRKO and Control mice fed upon high-fat diet. We quantified nitrotyrosine production and superoxide anion in the aortic roots by the staining intensity over the total area of the aorta. We observed a significant decrease of superoxide anion and levels of nitrotyrosine in the aortic roots from BATIRKO MH in comparison to the obese BATIRKO N mice. It is important to remember that this BATIRKO MH mouse presented greater levels of UCP-2 that could reduce ROS as well as RNS production and protect against vascular damage. Nonetheless, the BATIRKO N group with significantly reduced UCP-2 levels, was the one that showed the highest levels of superoxide anion and nitrotyrosine in the aortas and greater vascular damage (Figure 5.55).

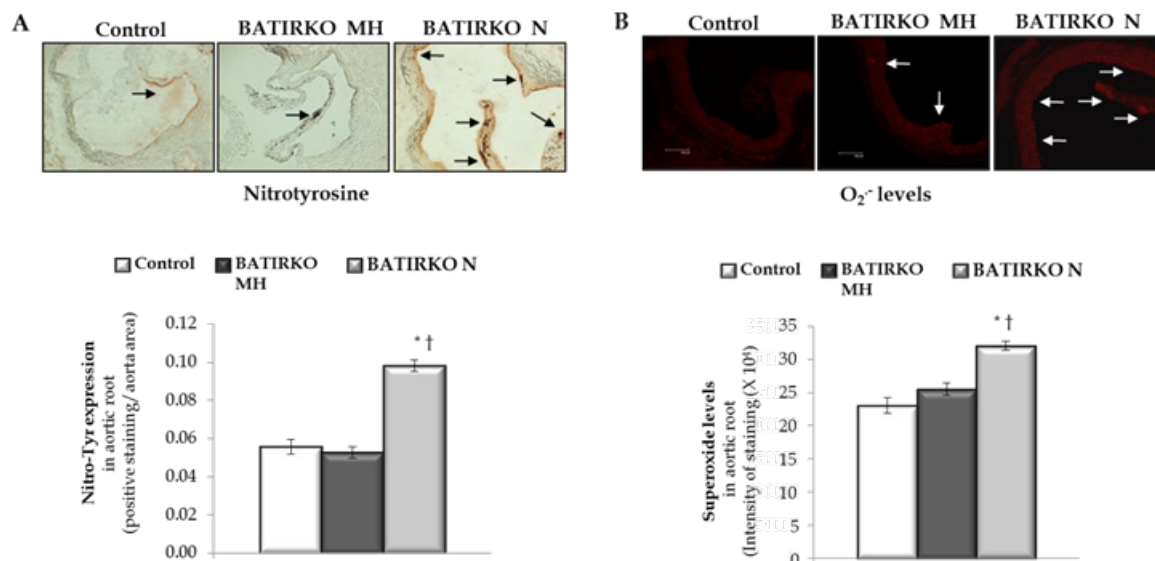


Figura 5.55. Estudio de la producción de radicales libres en los arcos aórticos del modelo BATIRKO sometido a dieta grasa. A. Fotografías representativas y su cuantificación de los niveles de RNS medidos mediante una inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-nitrotirosina en los arcos aórticos de ratones Control y BATIRKO sometidos a dieta grasa. B. Fotografías representativas y su cuantificación de los niveles in situ del anión superóxido por dihidroetididium en los arcos aórticos de ratones Control y BATIRKO sometidos a dieta grasa. * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH.

Figure 5.55. Study of the production of free radicals in the aortic roots from model BATIRKO under high-fat diet. A. Representative photographs and quantitated RNS levels measured by immunohistochemistry with anti-nitrotyrosine antibody in the aortic roots from BATIRKO and Control mice underwent high-fat diet. B. Representative pictures and quantification of superoxide anion levels by dihydroethidium in the aortic roots from Control and BATIRKO mice under high-fat diet. * $p < 0.05$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH.

5.2.6. Papel del iNOS en la modulación negativa de UCP-2 inducida por TNF- α in vitro e in vivo

La función correcta del endotelio depende en gran medida de la disponibilidad del óxido nítrico (NO), que participa en el control de la hemostasia, la regulación del tono vascular, la proliferación de células del músculo liso vascular y la homeostasis de la presión arterial, entre otras funciones (Dellamea et al. 2014). El óxido nítrico es una molécula lipofílica gaseosa de corta duración producido en casi todos los tejidos. Algunos autores han demostrado que en enfermedad cardiovascular existe un aumento de la expresión de iNOS, RNS y ROS. Además, se ha demostrado la implicación del NO producido por iNOS en el daño endotelial tanto en modelos in vivo como ex vivo (Chang et al. 2013).

5.2.6. iNOS role in the negative modulation of UCP-2 induced by TNF- α in vitro and in vivo

The correct function of the endothelium largely depends on nitric oxide (NO) availability, as NO participates in the control of hemostasis, the regulation of vascular tone, vascular smooth muscle cells proliferation, the homeostasis of arterial tension among other functions (Dellamea et al. 2014). Nitric oxide is a lipophilic gaseous short-lived molecule produced in almost every tissue. Some authors demonstrated that, in cardiovascular disease, an increase of the expression of iNOS, RNS and ROS exists. In addition, it has been demonstrated the involvement of NO produced by iNOS in the endothelial damage in in vivo as in ex vivo models (Chang et al. 2013).

In vitro, exploramos en las ECs y VSMCs, que son los principales componentes de la pared de la aorta, si la reducción en la expresión de UCP-2 inducida por el TNF- α (Figura 5.41), podría estar mediada al menos en parte por un aumento en la expresión de iNOS (Figura 5.56). En primer lugar, las líneas celulares vasculares fueron estimuladas con TNF- α a 10ng/ml durante 2, 4 y 8 horas. Se observó que el tratamiento con el TNF- α indujo un aumento significativo de la expresión del mRNA para iNOS por qRT-PCR. Este aumento de los niveles de iNOS fue superior al 100% de la expresión normal (Figura 5.56.A).

En segundo lugar, estudiamos la expresión proteica de UCP-2 en presencia de L-NAME, inhibidor de la iNOS, durante 30 minutos previo al tratamiento con TNF- α durante 2 horas (Figura 5.56.B). Se observó que el tratamiento previo con L-NAME normaliza los niveles proteicos de UCP-2 en las ECs o VSMCs tratadas con TNF- α . Estos datos sugieren que el TNF- α probablemente está regulando a la baja los niveles de expresión de UCP-2 a través del aumento de la expresión de iNOS en la pared aórtica.

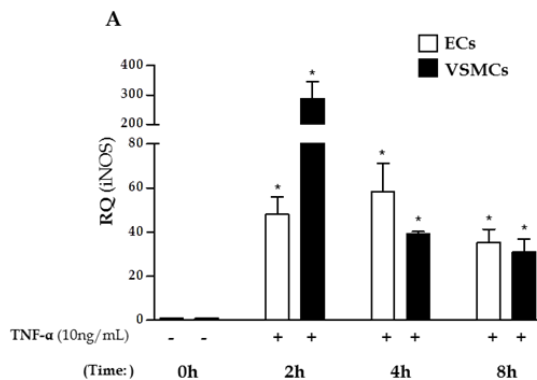


Figura 5.56. Papel de iNOS en la inhibición de los niveles de expresión de UCP-2 in vitro. A. Análisis de la expresión del mRNA de iNOS en ECs y VSMCs estimuladas con TNF- α durante 2, 4 y 8 horas por qRT-PCR. B. Análisis de la expresión proteica de UCP-2 en presencia o ausencia del inhibidor de iNOS (L-NAME) en células estimuladas con TNF- α por Western blot. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. células tratadas con TNF- α .

In vitro, we investigated in ECs and VSMCs, which are the main components of the aorta's wall, if the reduction of UCP-2 expression induced by TNF- α (Figure 5.41), could be mediated at least in part by an increase in iNOS expression (Figure 5.56). First of all, the vascular cell lines were stimulated with TNF- α at 10ng/ml during 2, 4 and 8 hours. We observed that the treatment with TNF- α induced a significant increase in iNOS mRNA expression by qRT-PCR. The increase of iNOS levels was superior by 100% to the normal expression (Figure 5.56.A).

Secondly, we studied the protein expression of UCP-2 in the presence of L-NAME, inhibitor of iNOS, during 30 minutes before treatment with TNF- α during two hours (Figure 5.56.B). We observed that the previous treatment with L-NAME normalized the protein levels of UCP-2 in ECs or VSMCs treated with TNF- α . These results suggest that TNF- α might down-regulate UCP-2 expression through iNOS overexpression in the aortic wall.

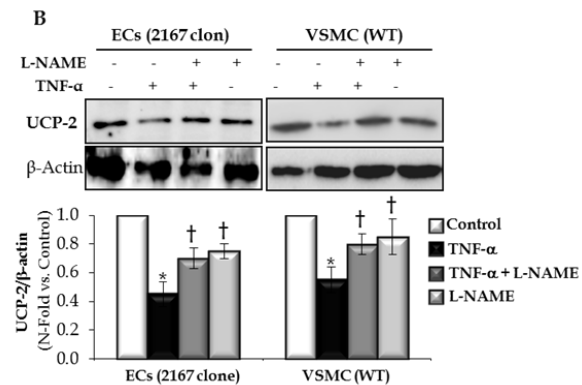


Figure 5.56. Role of iNOS in the inhibition of UCP-2 expression in vitro. A. Analysis of iNOS mRNA expression in ECs and VSMCs stimulated with TNF- α for 2, 4 and 8 hours by qRT-PCR. B. Western blot analysis of UCP-2 protein levels in the presence or absence of the inhibitor of iNOS (L-NAME) on cells stimulated by TNF- α . * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. cells treated with TNF- α .

Estudiamos la relación entre iNOS y UCP-2 *in vivo* en los diferentes modelos animales estudiados hasta el momento, basándonos en nuestros hallazgos *in vitro*. En primer lugar, determinamos la expresión de iNOS en la aorta y establecimos una correlación con los niveles hallados de UCP-2 en la aorta de los tres modelos experimentales estudiados (Figura 5.57).

En los ratones ApoE^{-/-}, se observó que existía un aumento significativo de los niveles de expresión de iNOS junto con una reducción significativa de los niveles de UCP-2 en la aorta a las 18 y 24 semanas de edad, pero principalmente a las 24 semanas, coincidiendo en el tiempo con la aparición más severa de la lesión aterosclerótica de este modelo (Figura 5.57.A). Por otra parte, solo los ratones BATIRKO N presentaron un aumento significativo de los niveles del mensajero para iNOS en la aorta. A su vez, estos animales presentaron los niveles más bajos de UCP-2 y un mayor daño vascular en comparación con los animales Control y BATIRKO MH (Figura 5.57.B). Finalmente, estudiamos los niveles de iNOS en el animal BATIRKO 52w y BATIRKO 52w tratado con anti-TNF- α . El animal BATIRKO 52w presentó alteraciones vasculares, metabólicas y disminución de los niveles de UCP-2. Se observó que el tratamiento con el anticuerpo anti-TNF- α durante las últimas seis semanas disminuyó significativamente los niveles de expresión de iNOS que presentó el ratón BATIRKO de 52 semanas, coincidiendo con un aumento de los niveles de UCP-2 (Figura 5.57.C).

We investigated the relationship between iNOS and UCP-2 *in vivo* in the different experimental models studied until now, using our findings *in vitro* as background. In first place, we assessed iNOS expression in the aorta and established a correlation with the levels of UCP-2 found in the aorta of the three studied experimental models (Figure 5.57).

In ApoE^{-/-} mice, we observed a significant increase in iNOS expression levels, joined with a significant reduction of UCP-2 levels in the aorta at 18 and 24 weeks of age, but mainly at 24 weeks of age, coinciding in time with the most severe appearance of atherosclerotic lesions in this model (Figure 5.57.A). On the other side, only the BATIRKO N mice showed a significant increase of the iNOS messenger in the aorta. In turn, these animals presented the lowest levels of UCP-2 and a greater vascular damage in comparison to the controls and BATIRKO MH (Figure 5.57.B). Finally, we studied iNOS levels in BATIRKO 52w and BATIRKO 52w treated with anti-TNF- α . The BATIRKO 52w animal presented vascular and metabolic alterations and a reduction of the levels of UCP-2. We observed that anti-TNF- α treatment during the last six weeks reduced significantly iNOS expression presented by the 52-week-old BATIRKO mice, coinciding with an increase of UCP-2 levels (Figure 5.57.C).

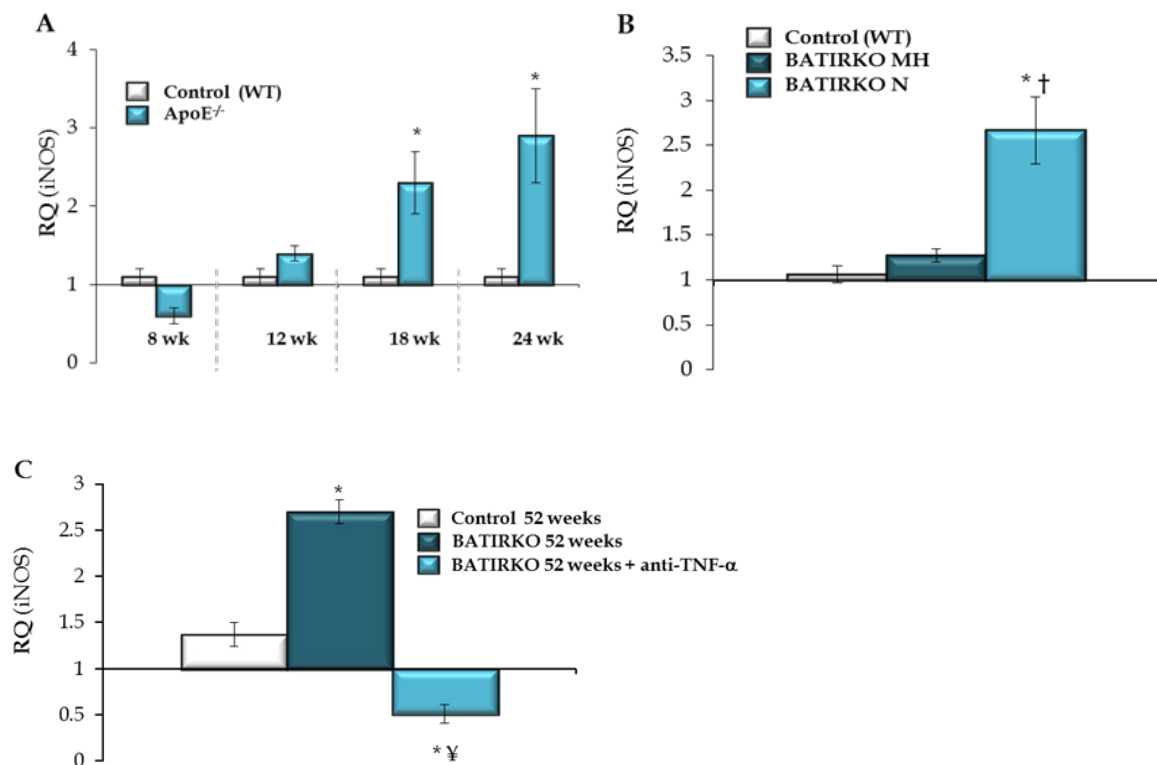


Figura 5.57. Niveles del mRNA de iNOS en la aorta de los modelos experimentales de daño vascular. Análisis de la expresión del mRNA de iNOS por qRT-PCR en la aorta de animales ApoE^{-/-} y controles a las 8, 12, 18 y 24 semanas de edad (A), BATIRKO de 33 semanas sometidos a dieta grasa y sus controles (B), BATIRKO de 52 semanas, BATIRKO de 52 semanas tratados con anti-TNF- α y sus controles (C). * $p < 0.05$ vs. sus respectivos Controles; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH; ‡ $p < 0.05$ vs. BATIRKO 52w.

Figure 5.57. iNOS mRNA levels in the aorta of vascular injury experimental models. Analysis of iNOS mRNA expression by qRT-PCR in aorta from ApoE^{-/-} and control mice at 8, 12, 18 and 24 weeks of age (A), 33-week-old BATIRKO and 33-week-old Control mice under high-fat diet (B), 52-week-old BATIRKO mice, 52-week-old BATIRKO mice treated with anti-TNF- α and their Control mice (C). * $p < 0.05$ vs. their respective controls; † $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH; ‡ $p < 0.05$ vs. BATIRKO 52w.

5.2.7. Efecto del Oleato sobre la expresión de UCP-2 in vitro

Anteriormente, in vitro demostramos que la insulina era capaz de aumentar la expresión UCP-2 (Figura 5.40). Para validar ese efecto de la insulina sobre la expresión de UCP-2, se comparó el efecto de la insulina con la expresión inducida por un ácido graso insaturado como el oleato, el cual es un conocido inductor de la expresión de UCP-2 en otras líneas celulares. Sin embargo, ácidos grasos saturados como el ácido palmítico solo se ha descrito que induzca aumento de UCP-2 en adipocitos (Yonezawa et al. 2008).

5.2.7. Oleate effect on UCP-2 expression in vitro

Previously, in vitro, we demonstrated that insulin is able to increase the expression of UCP-2 (Figure 5.40). In order to confirm this effect of insulin on the expression of UCP-2, we compared the effect of insulin with the expression induced by an unsaturated fatty acid such as the oleate, which is a well-known inducer of the expression of UCP-2 in other cell lines. Nevertheless, for saturated fatty acids such as palmitic acid it has been described to induce only an increase of UCP-2 in adipocytes (Yonezawa et al. 2008).

En primer lugar, las células vasculares (ECs y VSMCs) fueron estimuladas con oleato a 1 mM durante 2, 4, 8 y 18 horas. Posteriormente, analizamos la expresión de UCP-2 por qRT-PCR frente a sus respectivos controles. Se observó que tras el tratamiento con el oleato hay un aumento significativo en la expresión de UCP-2 a las 2 y 18 horas en las células endoteliales y a las 4 y 18 horas en las células de músculo liso vascular (Figura 5.58).

First, the vascular cells (ECs and VSMCs) were stimulated with oleate at 1mM for 2, 4, 8 and 18 hours. Subsequently, we analysed UCP-2 expression by qRT-PCR and compared to their respective controls. We observed that, following the treatment with oleate, there is a significant increase in the expression of UCP-2 at 2 and 18 hours in the endothelial cells and at 4 and 18 hours in the vascular smooth muscle cells (Figure 5.58).

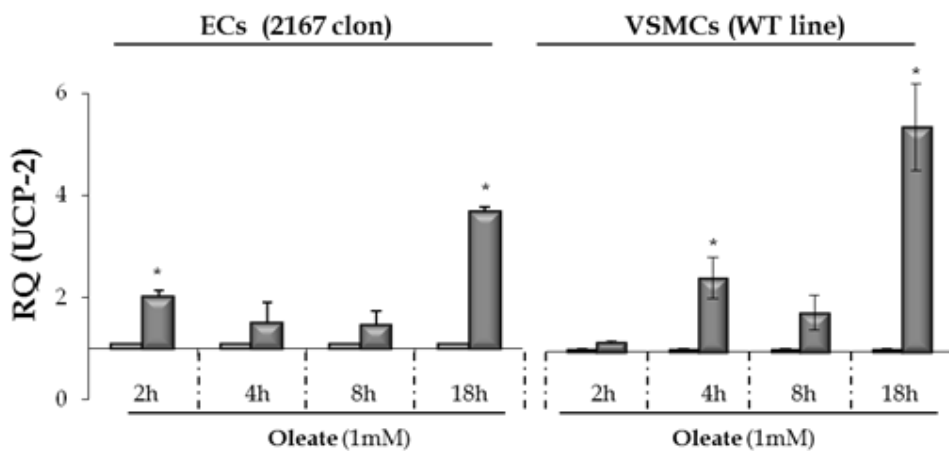


Figura 5.58. El oleato induce la expresión de UCP-2 en las células vasculares. La células endoteliales (A) y las células de músculo liso vascular (B) fueron estimuladas con el oleato a 1 mM durante 2, 4, 8 y 18 horas y se analizó la expresión del mRNA de UCP-2 por qRT-PCR. * $p < 0.05$ vs. control.

Figure 5.58. Oleate induces expression of UCP-2 in vascular cells. Endothelial cells (A) and vascular smooth muscle cells (B) were stimulated with oleate at 1 mM for 2, 4, 8 and 18 hours and UCP-2 mRNA expression was analysed by qRT-PCR. * $p < 0.05$ vs. control.

5.2.8. Efecto protector del oleato sobre la disminución de UCP-2 inducida por TNF- α

In vitro, habíamos demostrado que tanto la estimulación con insulina como con oleato inducían la sobreexpresión de los niveles de UCP-2. En contraste, mostramos que el tratamiento con TNF- α disminuyó significativamente los niveles proteicos de UCP-2 en las células vasculares, tanto a nivel basal como en aquellas que eran estimuladas con insulina (Figura 5.41).

5.2.8. Protector effect of oleate on the reduction of UCP-2 induced by TNF- α

In vitro, we demonstrated that insulin stimulation as well as oleate induced UCP-2 overexpression. In contrast, we showed that TNF- α treatment significantly reduced UCP-2 protein levels in vascular cells at basal level or when stimulated with insulin (Figure 5.41).

We decided to study whether the oleate could protect against the drop of UCP-2 levels induced by TNF- α . For this, both vascular cell lines were pre-treated with TNF- α (10ng/ml)

Nos planteamos estudiar si el oleato podría proteger frente al descenso en los niveles de UCP-2 que inducía el TNF- α . Para ello, ambas líneas vasculares se pretrataron con TNF- α (10ng/ml) durante dos horas y a continuación las estimulamos con oleato (1mM) durante 18 horas. A diferencia de la insulina, observamos que la presencia de oleato impedía que el TNF- α produjera un descenso de los niveles de UCP-2 en alguna de las líneas celulares estudiadas (Figura 5.59).

Se ha mostrado que la expresión del mRNA para UCP-2 en un contexto vascular puede estar regulada tanto por una hiperinsulinemia moderada como por un tratamiento con oleato. Adicionalmente, hemos demostrado que UCP-2 desempeña un papel importante en la prevención del daño endotelial y la progresión de la lesión aterosclerótica. Sin embargo, estos resultados dejaron claro que aunque la insulina inducía un aumento de la expresión proteica de UCP-2 in vitro, tiene un comportamiento diferencial al oleato en las células vasculares. El oleato evitó el descenso de la expresión de UCP-2 producidos por el pretratamiento con TNF- α , por lo cual se consideró estudiar el papel del oleato en el contexto cardiovascular.

during two hours and then, they stimulated with oleate (1mM) for 18 hours. In contrast with insulin, we observed that the presence of oleate prevented TNF- α from producing a drop in UCP-2 levels in some of the studied cells lines (Figure 5.59).

It has been demonstrated that UCP-2 mRNA expression in a vascular context could be regulated by a moderate hyperinsulinemia as well as a treatment with oleate. On top of that, we demonstrated that UCP-2 played an important role in the prevention of endothelial damage and atherosclerotic lesions. However, these results made clear that although insulin induced an increase in UCP-2 protein expression in vitro, there is a differential behaviour between insulin and oleate in vascular cells. The oleate prevented the drop in UCP-2 expression produced by the pre-treatment with TNF- α . For these reasons, we contemplated studying the role of oleate in cardiovascular context.

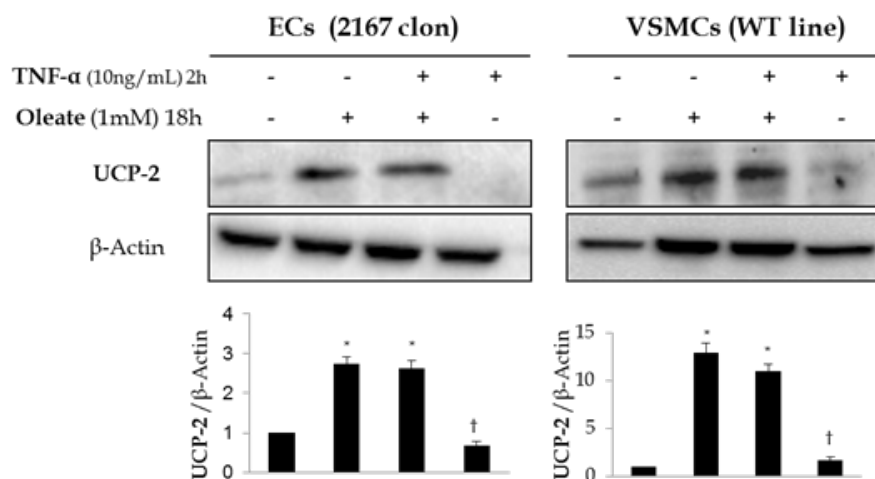


Figura 5.59. Efecto protector del oleato en los niveles de UCP-2 en células vasculares. Las líneas celulares vasculares se pretrataron con TNF- α (10 ng/ml) durante 2 horas previas al tratamiento con el oleato (1mM) durante 18 horas. Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. estímulo.

Figure 5.59. Protector effect of oleate in UCP-2 levels of vascular cells. The cells lines were pretreated with TNF- α (10 ng/ml) for 2 hours before a treatment with oelate (1 mM) during 18 hours. It was normalized against the endogenous level of β -actin. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. stimulus.

5.2.9. Efecto diferencial del oleato y el palmitato en la señalización de la insulina en las células cardiovasculares

Para estudiar los posibles mecanismos moleculares que ayuden a explicar los efectos beneficiosos del oleato frente al palmitato en el contexto cardiovascular, se utilizaron las células endoteliales (ECs), las células de músculo liso vascular (VSMCs) y adicionalmente, una línea de cardiomiocitos neonatales tipo silvestre (CMs) generados en nuestro laboratorio.

En primer lugar, caracterizamos la línea celular de CMs y confirmamos la expresión de marcadores de funcionalidad correspondientes a este tipo celular, antes y después de la inmortalización. Comprobamos la inmortalización de los CMs por la presencia de la expresión de antígeno T y p53 mediante Western blot (Figura 5.60.A). La presencia de ambas proteínas confirma que las células habían sido bien inmortalizadas. Posteriormente, demostramos la presencia de la proteína específica de cardiomiocitos, la troponina T (TnT), por Western blot (Figura 5.60.B). Además, también se comprobó la expresión de TnT en esta línea celular por otra técnica y para ello se realizó una inmunofluorescencia frente a este anticuerpo, que fue contrastada con la coloración para núcleos con DAPI (Figura 5.60.C).

5.2.9. Differential effect of oleic and palmitic acids in the insulin signalling in cardiovascular cells

In order to study the possible molecular mechanisms which help to understand the beneficial effects of oleate, in comparison to palmitate, in a vascular context, we used endothelial cells (ECs), vascular smooth muscle cells (VSMCs) and additionally a line of wild type neonatal cardiomyocytes (CMs) generated in our laboratory.

First, we characterized the CMs line and confirmed the expression of functionality markers that corresponded to this cell type, before and after immortalization process. We confirmed CMs immortalization by checking the existence of the expression of T-antigen and p53 through Western blot (Figure 5.60.A). The presence of both proteins confirmed that the cells had been correctly immortalized. Subsequently, we demonstrated the presence of the protein specific to cardiomyocytes, troponin T (TnT), by Western blot (Figure 40.60.B). In addition, we verified TnT expression in this cell line using another technique. We ran an immunofluorescence against this antibody which was counterstained by a coloration of the nuclei with DAPI (Figure 5.60.C).

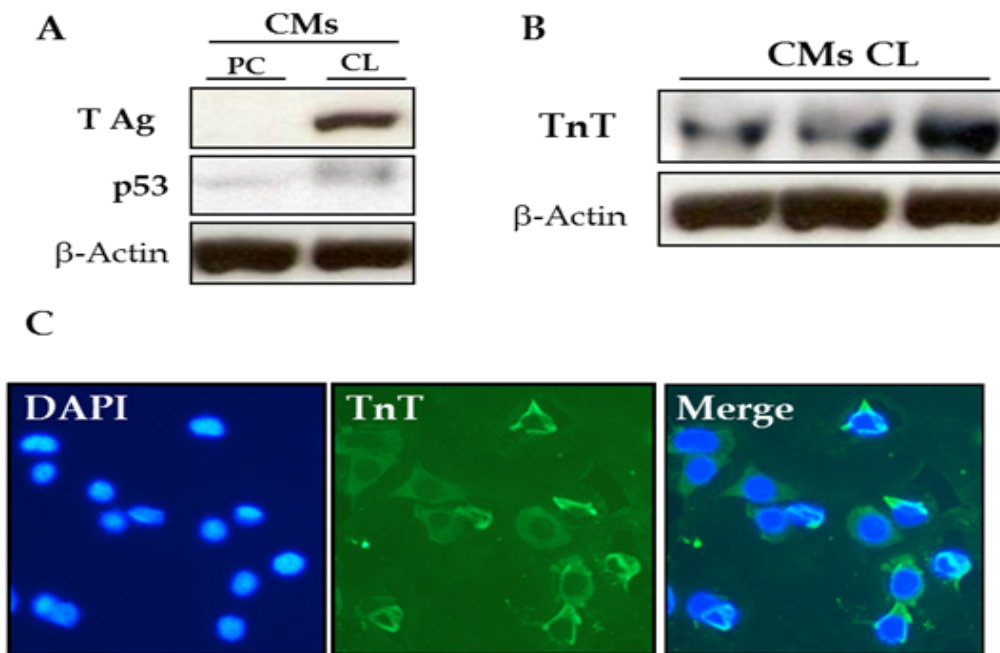


Figura 5.60. Caracterización de la línea de cardiomiocitos tipo silvestre (CMs) A. Confirmación de la immortalización de la línea de CMs por la presencia de antígeno T y p53 por Western blot. Análisis de la presencia de troponina (TnT), proteína específica de corazón, en CMs por Western blot (B) o por inmunofluorescencia (C).

Figure 5.60. Characterization of the wild type cardiomyocytes line (CMs) A. Immortalization confirmation of the CMs line by the presence of T-antigen and p53 by Western blot. Analysis of the presence of troponin T (TnT), specific heart protein, in CMs by Western blot (B) or by immunofluorescence (C).

A continuación, para seguir caracterizando la línea de CMs generados, analizamos la señalización de la insulina (Figura 5.61). En primer lugar, realizamos curvas de tiempo de respuesta a insulina, que nos permitiera determinar el tiempo menor al cual se ve activada las vías de señalización de la insulina. Se utilizó una concentración de insulina de 10 nM, que representa niveles fisiológicos de insulina. Se observó que la insulina a 10 nM estimuló la vía de PI3K, mediante un incremento significativo de la fosforilación de AKT, a partir de los 5 minutos y manteniéndose la señal a lo largo del tiempo. Por otro lado, la vía MAPKs fue activada por la insulina a 10 nM, aunque solo se presentó un aumento significativo de la fosforilación de P42/44 a los 5 minutos (Figura 5.61.A).

Posteriormente, se realizó una curva de dosis-respuesta frente a la insulina a los 5 minu-

Then, with the aim at keeping on characterizing the generated CMs line, we analysed insulin signalling (Figure 5.61). At first place, we performed time courses in response to insulin that allowed us to assess to the minimal time which insulin signalling pathways are activated. We used an insulin concentration of 10 nM which represents the physiological levels of insulin. We observed that insulin at 10 nM stimulated the PI3K pathway, through a significant increase in AKT phosphorylation, at 5 minutes and keeping the signal over time. On the other hand, the MAPK way was activated by insulin at 10 nM, although a significant increase of P42/44 phosphorylation was only observed at 5 minutes (Figure 5.61.A).

Subsequently, an insulin dose-response curve at 5 minutes, which is the shortest time to activate the signalling pathways. This test allowed us to discover the lowest insulin concentration to activate the intracellular signalling pathways

tos, que es el menor tiempo en el que se activan las rutas de señalización. Esta prueba permite conocer la menor concentración a la que la insulina activa las rutas de señalización intracelular en los CMs. Se observó un aumento de la fosforilación de AKT a la dosis de 10 nM y 100 nM de insulina (Figura 5.61.B). Sin embargo, la respuesta en la fosforilación de P42/44 fue moderada, debido a su alta expresión basal, probablemente por el ayuno prolongado (Figura 5.61.B).

in CMs. We observe that an increase of AKT phosphorylation at 10 nM and 100 nM insulin doses (Figure 5.61.B). Nonetheless, the response to P42/44 phosphorylation was moderated, because of its high basal expression, probably due to the prolonged fasting (Figure 5.61.B).

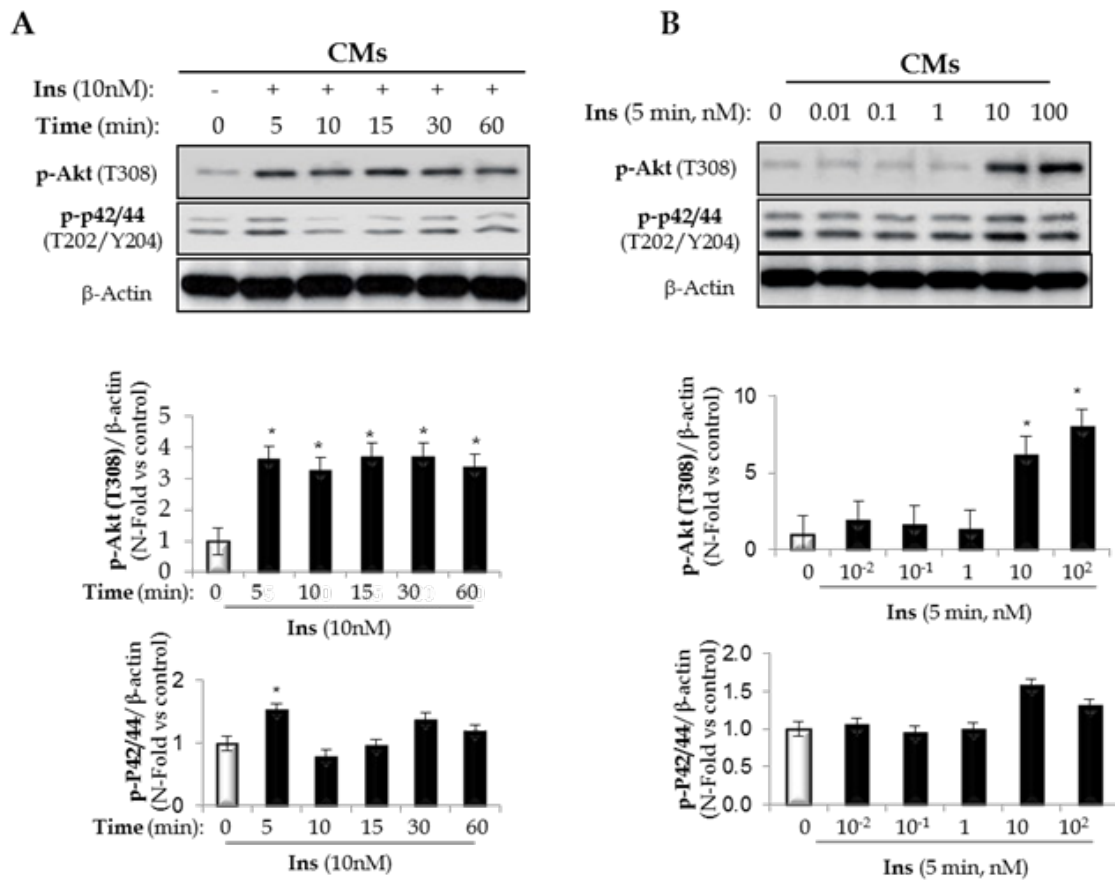


Figura 5.61. Señalización de la insulina en cardiomiocitos. Análisis mediante Western de la fosforilación en AKT (T308) y P44/42 (T202/Y204) en respuesta a insulina 10 nM a diferentes tiempos (A) o a diferentes dosis de insulina durante 5 minutos (B). Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. * $p < 0.05$ vs. Control.

Figure 5.61. Insulin signalling in cardiomyocytes. Analysis by Western blot of AKT (T308) and P44/42 (T202/Y204) phosphorylations in response to 10 nM insulin at several times (A) or at several insulin doses during 5 minutes (B). They were normalized against the endogenous level of β -actin. * $p < 0.05$ vs. control.

Los ácidos grasos son el sustrato preferente del metabolismo de los cardiomiocitos, puesto que los ácidos grasos son moléculas muy reducidas, su oxidación libera mucha energía en forma de ATP. La β -oxidación de los áci-

Fatty acids are the preferred substrate of cardiomyocytes metabolism, given that fatty acids are very small molecules, its oxidation releases a lot of energy in the form of ATP. Linear fatty acids β -oxidation is the main energy-produ-

dos grasos lineales es el principal proceso productor de energía, pero no el único. Algunos ácidos grasos, como los de cadena impar o los insaturados requieren, para su oxidación, modificaciones de la β -oxidación o rutas metabólicas distintas. Sin embargo, a su vez, los ácidos grasos están involucrados en la resistencia a la insulina vascular y en las complicaciones cardiovasculares. Por lo cual, nos planteamos estudiar el efecto de los ácidos grasos y la resistencia a la insulina producida por ellos, simulando una situación rica en grasas in vitro.

Para realizar este estudio escogimos dos ácidos grasos importantes en el contexto de la dieta y de la producción endógena, como son el ácido oleico y el ácido palmítico. El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado de cadena larga y el más abundante en el tejido adiposo humano, y puede proceder de la dieta. El otro ácido graso utilizado fue el ácido palmítico, que es el principal ácido graso saturado de cadena larga procedente de la dieta y es el segundo ácido graso que se produce durante la lipogénesis. A partir del palmitato se pueden formar otros ácidos grasos de cadena más larga o con dobles enlaces.

Una vez caracterizadas las tres líneas celulares y estudiada la vía de señalización de la insulina, nos planteamos si los ácidos grasos, oleato y palmitato, podrían tener un efecto diferencial sobre la resistencia a la insulina que explicara los perfiles cardiovasculares tan distintos de los ácidos grasos saturados e insaturados.

Para ello, en primer lugar estudiamos si el oleato producía resistencia a la insulina cardiovascular. Las células cardiovasculares fueron pre-tratadas con oleato a diferentes dosis durante 2 horas previas a la estimulación con insulina a 10 nM durante 5 min. Se analizaron la fosforilación de AKT y de AMPK. La activación de AMPK se estudió porque se ha demostrado que puede estar inducida por ácidos grasos e inhibida por la activación de AKT.

En primer lugar, estudiamos el efecto del oleato en la señalización de insulina en los cardio-

cer process, but not the only one. Some fatty acids, such as the impaired chain or unsaturated ones need, for their oxidation, modifications of the β -oxidation or distinct metabolic ways. Nevertheless, in turn, fatty acids are involved in vascular insulin resistance and in cardiovascular complications. Because of this, we decided to study the fatty acids effect and resistance to the insulin they produce, simulating a high-fat situation in vitro.

In order to carry out this study, we chose two fatty acids important in the diet context and the endogenous production, such as the oleic acid and the palmitic acid. The oleic acid is a monounsaturated long-chain fatty acid, the most abundant in human adipose tissue, and can come from diet. The other fatty acid used was the palmitic acid, which is the main saturated long-chain fatty acid originally from diet and the second fatty acid produced during lipogenesis. From the palmitate, different longer-chain or double bond fatty acids can be produced.

Once the three cells lines were characterized and insulin pathway studied, we investigated if the oleic and palmitic fatty acids may have a differential effect on insulin resistance that would explain such distinct cardiovascular profiles between saturated and unsaturated fatty acids.

In order to do this, we studied, in first place, whether oleate produced cardiovascular insulin resistance. Cardiovascular cells were pre-treated with various oleate doses during 2 hours previous to 10 nM insulin stimulation for 5 min. Then, we analysed AKT and AMPK phosphorylation. We studied AMPK activation due to it has been demonstrated that it could be activated by fatty acids and inhibited by AKT activation.

First of all, we studied oleate effect on insulin signalling in neonatal cardiomyocytes. Los CMs were treated with oleate at 0.6, 0.8 or 1 mM for 2 hours before insulin stimulation. We observed that insulin stimulation significant-

miocitos neonatales. Los CMs fueron tratados con 0.6, 0.8 o 1mM de oleato durante 2 horas previas a la estimulación con insulina. Se observó que la estimulación con insulina aumentó significativamente la fosforilación de AKT a todas las dosis de oleato empleadas en los CMs. Por otro lado, la activación de AKT en presencia de insulina inactivó la fosforilación de AMPK. Sin embargo, en ausencia de insulina se pudo observar la activación de AMPK, especialmente a una dosis de oleato de 0.8 mM. Por tanto, nuestros resultados sugerían que el tratamiento con oleato durante 2 horas, no producía resistencia a la insulina en los cardiomiocitos (Figura 5.62).

ly increased AKT phosphorylation for each dose of oleate used in CMs. In the other hand, AKT activation in presence of insulin inactivated AMPK phosphorylation. Nevertheless, in case of a lack of insulin, we could observe AMPK activation, especially with the 0.8 mM dose of oleate. In consequence, our results suggest that a treatment with oleate during 2 hours did not produce insulin resistance in cardiomyocytes (Figure 5.62).

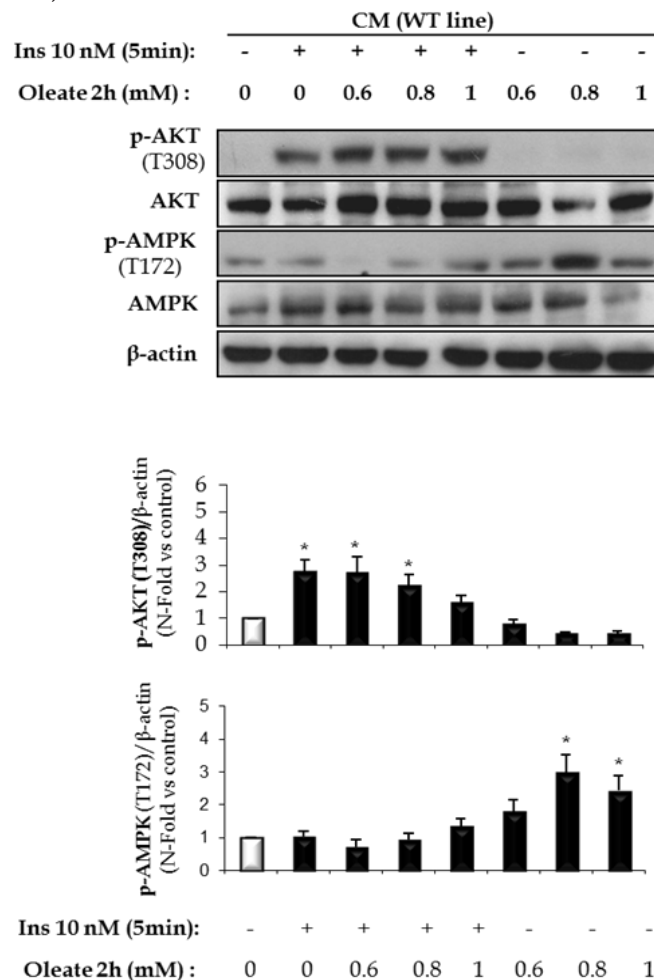


Figura 5.62. Efecto del oleato en la señalización de la insulina en los cardiomiocitos. Se analizó la fosforilación en AKT y AMPK inducida por insulina tras estimulación con diferentes dosis de oleato por Western blot. Se normalizó frente al nivel endógeno de β-actina. *p<0.05 vs. control.

Figure 5.62. Oleate effect in insulin signalling in cardiomyocytes. AKT and AMPK phosphorylation induced by insulin after stimulation with various doses of oleate was analysed by Western blot. It was normalized against the endogenous level of β-actin. *p<0.05 vs. control.

Puesto que el tratamiento con diferentes dosis de oleato durante 2 horas no generó resistencia a la insulina en los CMs, nos planteamos estudiar el efecto del oleato en las células vasculares (ECs y VSMCs), analizando no solo la vía de PI3K sino también la vía de las MAPKs. Las células vasculares fueron tratadas con oleato a 0.8 mM durante 2 horas previas a la estimulación con insulina a 10 nM durante 10 minutos. A continuación, analizamos por Western blot la fosforilación de AKT (T308), P42/44 (T202/Y204), P70S6K (T389) y AMPK (T172) (Figura 5.63). Se observó que el oleato no producía resistencia a la insulina ni en las células endoteliales, ni en las células de músculo liso vascular debido a que mantenía de forma significativa la fosforilación de AKT, P42/44, p70S6K inducida por la insulina (Figura 5.63). Además, al igual que observábamos en los CMs, en presencia de insulina se inhibía la activación de AMPK en ambas líneas vasculares. Por el contrario, en ausencia de insulina, el oleato inducía la fosforilación y activación de AMPK (Figura 5.63).

Given that the treatment with several doses of oleate during 2 hours did not generate insulin resistance in CMs, we decided to study the effect of oleate in vascular cells (ECs and VSMCs), analysing not only the PI3K way but MAPKs way as well. The vascular cells were treated with oleate at 0.8 mM for 2 hours before being stimulated with insulin at 10 nM during 10 minutes. Next, we analysed AKT (T308), P42/44 (T202/Y204), P70S6K (T389) y AMPK (T172) phosphorylation by Western blot (Figure 5.63). We observed that the oleate did not produce insulin resistance neither in endothelial cells nor in vascular smooth muscle cells, as it significantly kept the AKT, P42/44 and p70S6K phosphorylation induced by insulin (Figure 5.63). In addition, like we observed in CMs, in the presence of insulin, AMPK activation was inhibited in both cells lines. In contrast, with a lack of insulin, the oleate induced AMPK phosphorylation and activation (Figure 5.63).

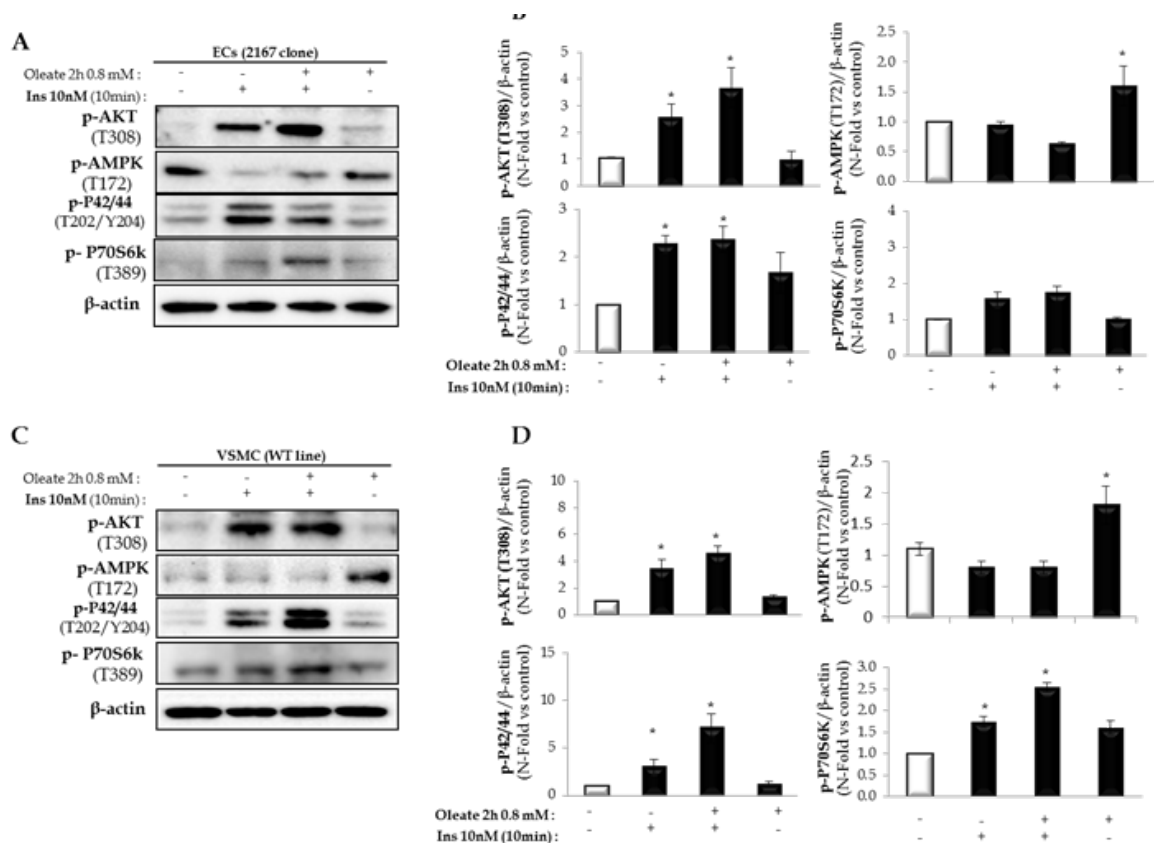


Figure 5.63. Efecto del oleato en la señalización de la insulina en las células vasculares. Las células vasculares fueron tratadas con oleato a 0.8 mM durante 2 horas previas a la estimulación con insulina a 10 nM durante 10 minutos. A continuación, realizamos el análisis mediante Western blot de las fosforilaciones de AKT (T308), P42/44 (T202/Y204), p70S6K (T389) y AMPK (T172) en las ECs (A y B) y VSMCs (C y D). Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. Los apartados A y C corresponden con los geles representativos de los Western blot, mientras que los apartados B y D serían las cuantificaciones correspondientes de al menos 5 experimentos. * $p < 0.05$ vs. cada control.

Figure 5.63. Oleate effect on insulin signalling in vascular cells. Vascular cells were treated with oleate at 0.8 mM for 2 hours before a stimulation with insulin at 10 nM during 10 minutes. Next, Western blot analysis of AKT (T308), P42/44 (T202/Y204), p70S6K (T389) and AMPK (T172) phosphorylation in ECs (A and B) and VSMCs (C and D). It was normalized against the endogenous level of β -actin. Sections A and C correspond to representative gels by Western blots while sections B and D are their corresponding quantifications. Experiments were performed at least 5 times. * $p < 0.05$ vs. each control.

Anteriormente, hemos demostrado que el tratamiento con oleato durante 2 horas no produce resistencia a la insulina en las tres células cardiovasculares estudiadas. Teniendo en cuenta, que dos horas de tratamiento con oleato podría ser un tiempo corto para producir resistencia a la insulina, realizamos experimentos adicionales donde tratamos tanto a las ECs como VSMCs con diferentes dosis de oleato durante 18 horas. Los mismos resultados que obtuvimos con las 2 horas de pretratamiento con oleato, encontramos cuando las células eran pretratadas durante las 18 horas. Así, el

Previously, we demonstrated that a treatment with oleate during 2 hours did not produce insulin resistance in the three cardiovascular cells studied. Taking into account that a two hour-long treatment with oleate could be a short time to produce insulin resistance, we made additional experiments in which we treated ECs and VSMCs with various doses of oleate over a period of 18 hours. We found the same results when we pretreated the cells with oleate during 18 hours as we did a 2 hour-long pre-treatment. Thus, this 18 hour-long pre-treatment was never able to reduce the AKT phosphorylation induced by insulin

pretratamiento durante 18 horas con oleato a ninguna de la dosis empleada fue capaz de reducir la fosforilación de AKT inducida por insulina (Figura 5.64). Por lo tanto, podemos decir que el oleato no produce resistencia a la insulina en las células cardiovasculares, ni a dosis altas ni a tiempos prolongados.

whatever the dose of oleate we tested (Figure 5.64). In conclusion, we can say that oleate does not generate insulin resistance in cardiovascular cells, neither with a high dosage nor in prolonged times.

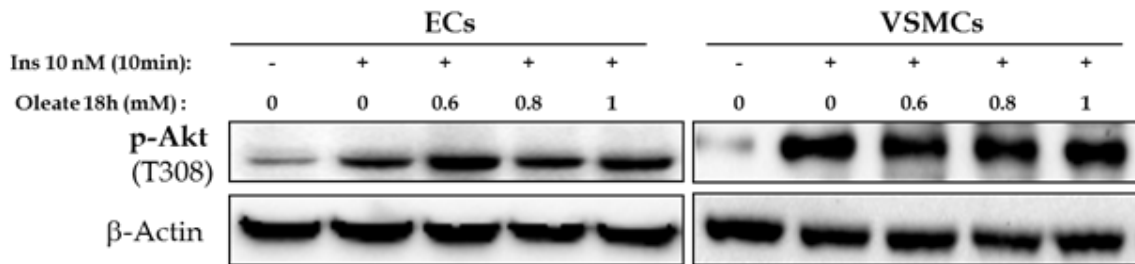


Figura 5.64. Efecto del pretratamiento con oleato a 18 horas en la señalización de la insulina en las células vasculares. Se analizó mediante Western blot la fosforilación de AKT (T308) inducida por insulina en células vasculares pretratadas con oleato a 0.6, 0.8 o 1mM durante 18 horas. Se normalizó frente al nivel endógeno de β-actina.

Figure 5.64. Effect of the pretreatment with oleate at 18 hours in insulin signalling in vascular cells. The AKT (T308) phosphorylation induced by insulin in vascular cells pretreated with oleate at 0.6, 0.8 or 1 mM during 18 hours was analysed by Western blot. It was normalized against the endogenous level of β-actin.

Estudios recientes han demostrado que los ácidos grasos libres se asocian con la inflamación crónica, que puede estar involucrado en la lesión vascular. Además, se ha descrito que el ácido palmítico induce disfunción endotelial al reducir la activación de la vía AMPK/eNOS (Lee C. et al. 2014a).

Recent studies showed that free fatty acids are associated with chronic inflammation, which can be involved in vascular lesion. In addition, it has been described that palmitic acid induces endothelial dysfunction by reducing the activation of the AMPK/eNOS pathway (Lee C. et al. 2014a).

Para analizar el efecto del palmitato sobre la señalización de la insulina, utilizamos la dosis de 0.4 mM que es una concentración muy similar a la utilizada por otro grupo para inducir resistencia a la insulina en miocitos (Salvadó et al. 2013) y a la que nosotros previamente obtuvimos que inducía la máxima fosforilación de AMPK en los cardiomiocitos. Probaron diferentes tiempos (2, 6, 18 y 24 horas) de tratamiento con el palmitato para determinar la aparición de resistencia a la insulina (Figura 5.65). Se observó que el tratamiento con palmitato a 0.4 mM no redujo la fosforilación inducida por insulina de AKT ni la de P42/44 entre las 2 y 6 horas en CMs. Sin embargo, a tiempos más prolongados, 18 y 24 horas, el palmitato indujo resistencia a la insulina debi-

An order to analyse the effect of palmitate on insulin signalling, we used a dose of 0.4 mM which is very similar used by other group to induce insulin resistance in myocytes (Salvadó et al. 2013), and for which we previously observed it induced AMPK maximum phosphorylation in cardiomyocytes. We tested several palmitate treatment times (2, 6, 18 and 24 hours) to find out when insulin resistance appeared (Figure 5.65). We observed that the treatment with palmitate at 0.4 mM did not reduce the phosphorylation neither induced by AKT insulin nor P42/44 insulin between 2 and 6 hours in CMs. However, at longer periods of time (18 and 24 hours), palmitate induced insulin resistance as it produced a significant reduction of AKT and P42/44 phos-

do a que producía una disminución significativa de la fosforilación de AKT y P42/44 inducida por insulina (Figura 5.65).

Estos resultados marcaron una diferencia de comportamiento entre los ácidos grasos utilizados en este estudio en relación a la señalización de la insulina. El ácido oleico no generó resistencia a la insulina, ni a concentraciones elevadas, ni a tiempo cortos ni largos. Sin embargo, el ácido palmítico a concentraciones bajas y a tiempos prolongados, entre 18 y 24 horas, produjo resistencia a la insulina cardiovascular.

phorylation induced by insulin (Figure 5.65).

These results indicate a differential behaviour between the various fatty acids used in this study in relation to insulin signalling. Oleic acid did not generate insulin resistance, neither in elevated concentrations nor in short or long times. Nonetheless, palmitate with low concentration and prolonged times (between 18 and 24 hours) produced cardiovascular insulin resistance.

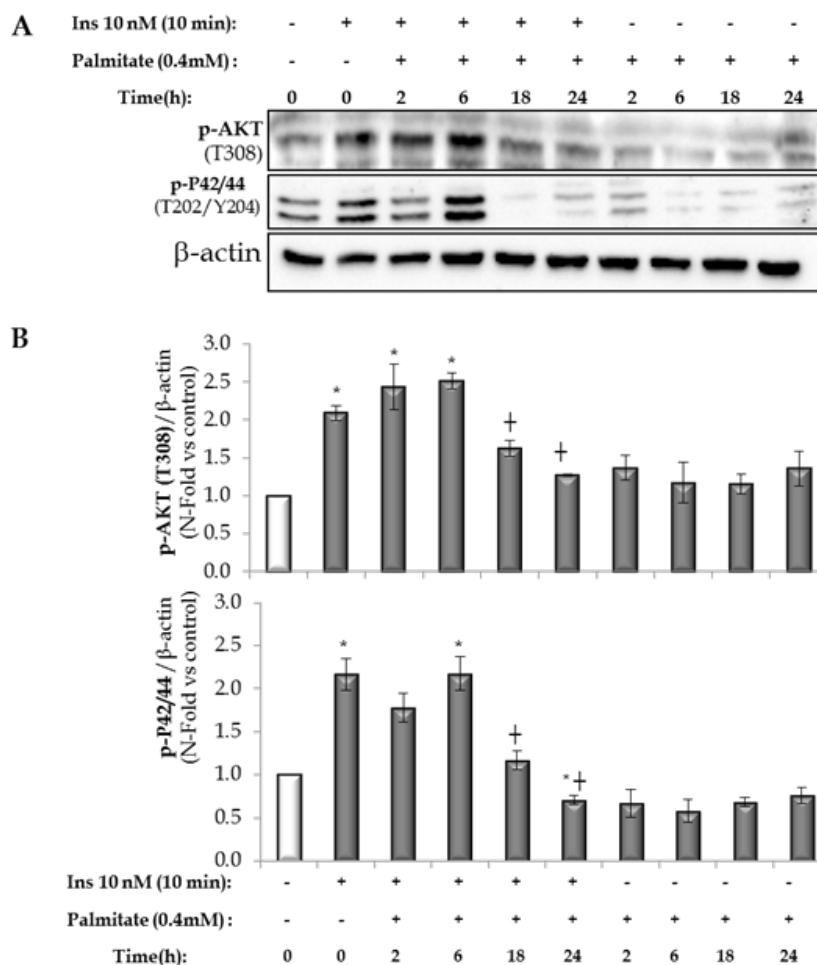


Figura 5.65. Efecto del palmitato en la señalización de la insulina en cardiomiocitos. Los cardiomiocitos fueron estimulados con palmitato a 0.4 mM durante 2, 6, 18 y 24 horas. Se analizó la fosforilación de AKT (T308) y P42/44 (T202/Y204). El apartado A se corresponde con los geles representativos de los Western blot realizados mientras que el apartado B son las cuantificaciones de al menos cinco experimentos. Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. insulina.

Figure 5.65. Palmitate effect on insulin signalling in cardiomyocytes. Cardiomyocytes were stimulated with palmitate at 0.4 mM for 2, 6, 18 and 24 hours. AKT (T308) and P42/44 (T202/Y204) phosphorylation was analysed. Section A corresponds to Western blots representative gels run while section B presents the quantifications of at least 5 experiments. It was normalized against the endogenous level of β -actin. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. insulin.

La resistencia a la insulina es un factor de riesgo importante para la enfermedad cardiovascular y la aterosclerosis. Nosotros, previamente, demostramos que el palmitato a concentraciones bajas (0.4mM) indujo resistencia a la insulina entre las 18 y 24 horas en los CMs (Figura 5.65). Nos planteamos estudiar el efecto del palmitato en las células vasculares, ECs y VSMCs, utilizando las mismas condiciones anteriormente descritas para los CMs.

Las células CMs, ECs y VSMCs fueron tratadas con palmitato a 0.4mM durante 18 horas. Posteriormente, analizamos y cuantificamos la fosforilación de AKT (T308), P42/44 (T202/Y204) y p70S6K (T389) mediante Western blot. Comprobamos que las tres líneas celulares (CMs, ECs y VSMCs) presentaron resistencia a la insulina inducida por palmitato, puesto que se observó una disminución significativa en la fosforilación de estas proteínas que participan en la vía de señalización de la insulina, como AKT, P42/44 y p70S6K (T389) (Figura 5.66).

Insulin resistance is an important risk factor for the cardiovascular disease and atherosclerosis. We previously demonstrated that palmitate at low concentration (0.4 mM) induced insulin resistance between 18 and 24 hours in CMs (Figure 5.65). We decided then to study the effect of palmitate in vascular cells, ECs and VSMCs, using the same conditions described before for CMs.

CMs, ECs and VSMCs were treated with palmitate at 0.4 mM for 18 hours. Then we analysed and quantified AKT (T308), P42/44 (T202/Y204) and p70S6K (T389) phosphorylation with Western blot. We tested if the three cell lines (CMs, ECs and VSMCs) presented a palmitate induced insulin resistance, given that we observed a significant reduction of the phosphorylation of these proteins which participate in insulin signalling pathway such as AKT, P42/44 and p70S6K (T389) (Figura 5.66).

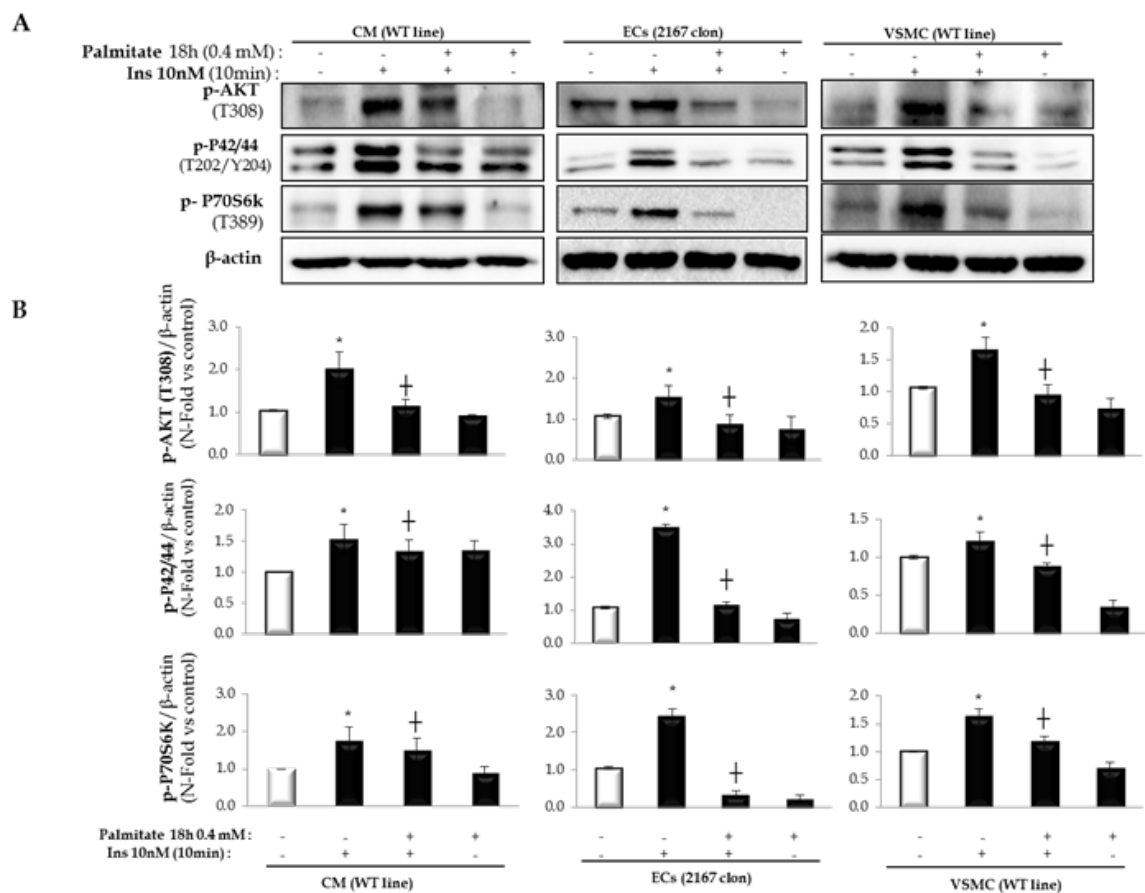


Figura 5.66. El palmitato induce resistencia a la insulina en las células cardiovasculares. Las células fueron pretratadas con palmitato a 0.4 mM durante 18 horas y estimuladas con insulina a 10 mM durante 10 minutos. Se analizó la fosforilación de AKT (T308), P42/44 (T202/Y204) y P70S6K (T389) mediante Western blot en células CMs (paneles de la izquierda), ECs (paneles centrales) y VSMCs (paneles de la derecha). Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. insulina.

Figure 5.66. Palmitate induces insulin resistance in cardiovascular cells. Cells were pretreated with palmitate at 0.4 mM for 18 hours and stimulated with insulin at 10 mM during 10 minutes. AKT (T308), P42/44 (T202/Y204) and P70S6K (T389) phosphorylation was analysed by Western blot in CMs (left panels), ECs (middle panels) and VSMCs (right panels). It was normalized against the endogenous level of β -actin. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. insulin.

Muchos autores han descrito que los ácidos grasos libres (FFAs) participan en una amplia gama de funciones dentro del organismo, pero también se ha relacionado con un efecto lipotóxico y con la generación de estrés oxidativo en algunos tipos celulares como en los hepatocitos y en las células de músculo esquelético (Boden 2001; Chavez 2005).

En las células de músculo liso vascular se ha relacionado el ácido palmítico con un aumento de las citoquinas proinflamatorias, las cuales podrían favorecer la progresión de la placa aterosclerótica (Shen et al. 2013). Estos efectos

Many authors described that free fatty acids (FFAs) play a role in a wide range of functions in the organism but FFAs have been related as well, with a lipotoxicity effects and generation of oxidative stress in sort of cell type likewise hepatocytes and skeletal muscle cells (Boden 2001; Chavez 2005).

In vascular smooth muscle cells, the palmitic acid has been related to an increase of pro-inflammatory cytokines, which could facilitate the progression of atherosclerotic plaque (Shen et al. 2013). These effects seem to depend on long-chain saturated fatty acids (SFA). Thus, exposition to SFA, such as the

parecen ser dependientes de los ácidos grasos saturados de cadena larga (SFA). Así, la exposición a los SFA, como el ácido palmítico o el esteárico, podrían producir apoptosis. Sin embargo, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), como el oleato, parecen tener un efecto protector cuando se combinan con los SFA (Leamy et al. 2014).

En este trabajo, nosotros hemos demostrado que el oleato y el palmitato tienen un efecto diferencial sobre la señalización de la insulina. Hemos visto que el palmitato, al igual que el TNF- α , induce resistencia a la insulina vascular. Sin embargo, el oleato a diferentes dosis y tiempos no fue capaz de afectar a la señalización de la insulina en ninguna de las tres líneas cardiovasculares estudiadas. Llegados a este punto, no sólo queríamos ver que el oleato no producía resistencia a la insulina, sino también si era capaz de proteger frente a la resistencia a la insulina inducida por el palmitato o por una citoquina proinflamatoria, como el TNF- α .

Para ello, las diferentes líneas celulares, CMs, ECs y VSMCs, fueron pretratadas con oleico a 0.8 mM durante 2 horas previas al tratamiento con palmitato a 0.4 mM durante 18 horas o TNF- α a 10 ng/ml durante 2 horas. Previamente, habíamos demostrado que el palmitato a 18 horas (Figura 5.66) o el TNF- α a 2 horas (Figura 5.41.A) inducían resistencia a la insulina vascular. Finalmente, las células fueron estimuladas con insulina a 10 nM, durante 10 minutos y se analizó la fosforilación de AKT para ver el efecto sobre la señalización de insulina (Figura 5.67).

Evidentemente, en las células tratadas únicamente con TNF- α o palmitato y estimuladas con insulina, se observó una disminución significativa de la fosforilación de AKT en comparación con las células estimuladas con insulina. Sin embargo, las células que fueron pretratadas con oleato, se mantuvo la fosforilación de AKT inducida por insulina tanto en presencia de TNF- α como de palmitato (Figura 5.67). Estos resultados sugieren que el oleato no sólo no produce resistencia a la insulina

palmitic acid or the stearic acid, may produce apoptosis. Nevertheless, monounsaturated fatty acids (MUFA), such as the oleate, seem to have a protector effect when combined with SFA (Leamy et al. 2014).

In this work, we demonstrated that oleate and palmitate have a differential effect on insulin signalling. We observed that palmitate, like TNF- α , induces vascular insulin resistance. Nonetheless, oleate at various doses and times was not able to affect insulin signalling in any of the three cardiovascular cell lines studied. At this point, not only did we want to assess that oleate did not produce insulin resistance but we wanted to know, as well, whether it was able to protect against insulin resistance induced by palmitate or pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α .

For that, the different cells lines (CMs, ECs and VSMCs) were pretreated with oleic acid at 0.8 mM for 2 hours before a treatment with palmitate at 0.4 mM during 18 hours or TNF- α at 10 ng/ml during 2 hours. Previously, we demonstrated that palmitate at 18 hours (Figure 5.66) or TNF- α at 2 hours (Figure 5.41.A) induced vascular insulin resistance. Eventually, the cells were stimulated with insulin at 10 nM for 10 minutes and we analysed AKT phosphorylation in order to see the effect on insulin signalling (Figure 5.67).

Clearly, in the cells only treated with TNF- α or palmitate and stimulated with insulin, it was observed a significant reduction in AKT phosphorylation in comparison to the cell insulin-induced with. However, in the cells pre-treated with oleate, AKT phosphorylation induced by insulin was also maintained in the presence of TNF- α and in the presence of palmitate (Figure 5.67). These results suggest that oleate not only produces insulin resistance but is able to protect against insulin resistance induced by palmitate or TNF- α in cardiovascular cells.

si no que es capaz de proteger frente a la resistencia a la insulina inducida por el palmitato o el TNF- α en células cardiovasculares.

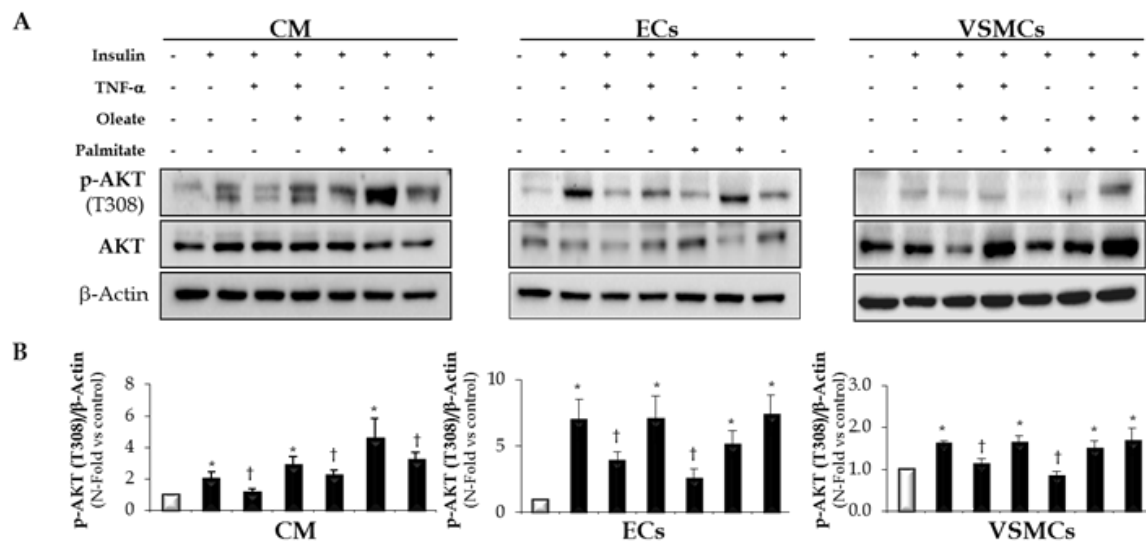


Figura 5.67. Efecto protector del oleato frente a la resistencia a la insulina cardiovascular inducida por el TNF- α o el palmitato. Las líneas cardiovasculares fueron pretratadas con oleato (0.8 mM) durante 2 horas previas al tratamiento con palmitato (0.4 mM) durante 18 horas o TNF- α (10ng/ml) durante 2 horas y estimuladas con insulina (10mM) durante 10 minutos. Fotografías representativas de los Western blot (A) y las gráficas (B) de las cuantificaciones de la fosforilación de AKT (T308) en CMs (paneles de la izquierda), ECs (paneles centrales) y VSMCs (paneles de la derecha). Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. Los experimentos se realizaron al menos cinco veces. * p <0.05 vs. control; † p <0.05 vs. insulina.

Figure 5.67. Protector effect of oleate against cardiovascular insulin resistance induced by el TNF- α or palmitate. The cardiovascular lines were pre-treated with oleate (0.8 mM) for 2 hours before a treatment with palmitate (0.4 mM) during 18 hours or TNF- α (10ng/ml) during 2 hours and stimulated with insulin (10 mM) during 10 minutes. Western blots representative pictures (A) and graphs (B) of quantifications of AKT (T308) phosphorylation in CMs (left panels), ECs (middle panels) and VSMCs (right panels). It was normalized against the endogenous level of β -actin. The experiments were carried out at least five times. * p <0.05 vs. control; † p <0.05 vs. insulin.

Uno de los mecanismos previamente propuesto por el cual el oleato podría estar protegiendo frente al daño cardiovascular, sería el aumento que induce de UCP-2 en presencia o no de TNF- α (Figura 5.58 y 5.59). Sin embargo, pensamos que podría haber otros mecanismos involucrados que apoyaran el papel protector del oleato a nivel cardiovascular. En este sentido, nos planteamos que el TNF- α y el palmitato podrían estar activando diferentes vías como la de la MAPKs o la del factor de transcripción de NF- κ B, y que el oleato podría estar protegiendo a esos niveles.

Es muy conocido el papel que juega el TNF- α en diferentes respuestas celulares, mediante la

One of the previously proposed mechanisms, according to which oleate may be protecting against cardiovascular damage, could be the increase it induces in UCP-2 in presence or absence of TNF- α (Figure 5.58 and 5.59). Nonetheless, we thought other mechanisms may be involved and aiming in the protective role of oleate at cardiovascular level. In this regard, we contemplated the possibility that TNF- α and palmitate may be activating several ways as the MAPKs one or the one of the NF- κ B transcription factor and that oleate may be protecting at these levels.

The role played by TNF- α in several cells responses is well-known, by MAPKs activation, including ERK 1/2, p38 MAPK and JNK1/2.

activación de las MAPKs, incluyendo ERK 1/2, p38 MAPK y JNK1/2. Este efecto no se limita al inducido por el TNF- α , varios estímulos extracelulares provocan un amplio espectro de respuestas biológicas mediadas a través de la activación de MAPKs (Lee et al. 2013). Por lo cual, se planteó también que el efecto del palmitato sobre las células cardiovasculares podría estar mediado, al menos en parte, a través de la activación de JNK1/2.

Se estudió la fosforilación de JNK1/2 (T183/Y185) mediante Western blot en las tres líneas celulares (CMs, ECs y VSMCs). Las células se pretetaron con oleato a 0.8 mM durante 2 horas previas al tratamiento con TNF- α (10ng/ml, 2 horas) o palmitato (0.4mM, 18 horas). Finalmente, las células fueron estimuladas con insulina durante 10 minutos. En las tres líneas celulares, se observó que tanto el TNF- α como el palmitato aumentaron la fosforilación de JNK1/2. Además, el pretratamiento con oleato disminuyó la fosforilación de JNK, reduciendo el estrés producido tanto por el TNF- α como por el palmitato (Figura 5.68).

This effect is not limited to the one induced by TNF- α , several extracellular stimuli cause a wide range of biological responses measured by MAPKs activation (Lee et al. 2013). For this reason, we decided to investigate if the effect of palmitate on cardiovascular cells could be measure, at least in part, through JNK1/2 activation.

We studied JNK1/2 (T183/Y185) phosphorylation by Western blot in the three cells lines (CMs, ECs and VSMCs). The cells were pretreated with oleate at 0.8 mM during 2 hours before a treatment with TNF- α (10ng/ml, 2 hours) or palmitate (0.4mM, 18 hours). Finally, the cells were stimulated with insulin during 10 minutes. In the three cells lines, we observed that TNF- α as well as palmitate increased JNK1/2 phosphorylation. On top of that, the pretreatment with oleate reduced JNK phosphorylation, decreasing the stress produced by TNF- α and palmitate (Figure 5.68).

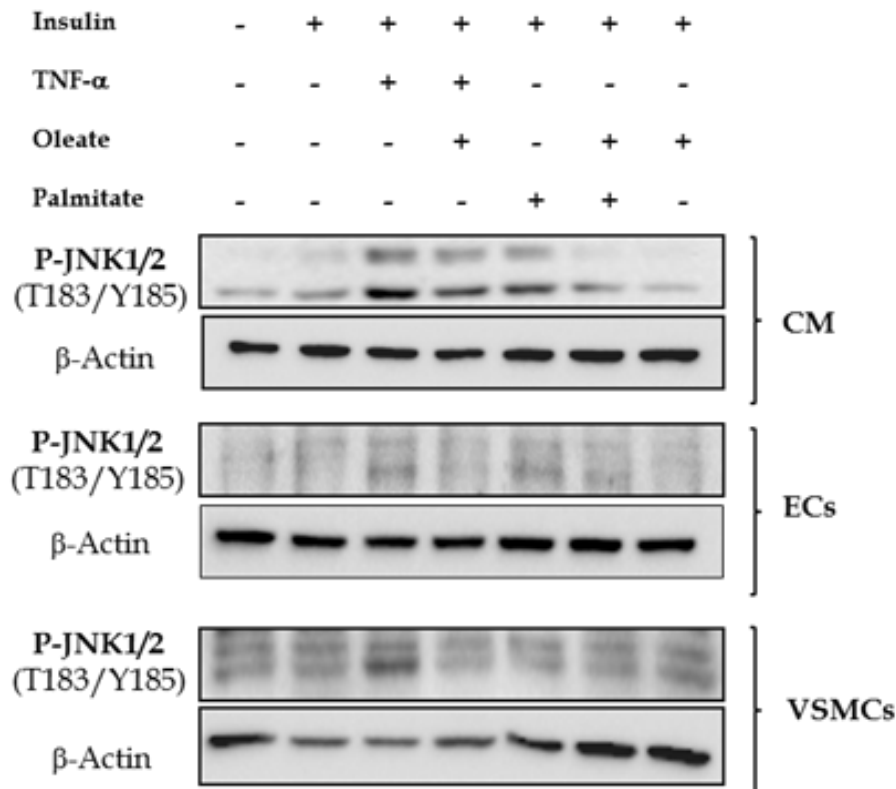


Figura 5.68. Efecto del oleato en la activación de JNK1/2 inducido por TNF- α y palmitato en células cardiovasculares. Se analizó mediante Western blot la fosforilación de JNK (T183/Y185) en las líneas celulares CMs (paneles superiores), ECs (paneles centrales) y VSMCs (paneles inferiores). Las células fueron pretratadas con oleato a 0.8 mM, tratadas con TNF- α (10 ng/ml) o palmitato (0.4 mM) y estimuladas con insulina (10 nM). Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina.

Figure 68. Oleate effect on JNK1/2 activation induced by TNF- α - and palmitate in cardiovascular cells. JNK (T183/Y185) phosphorylation in CMs (top panels), ECs (middle panels), and VSMCs (bottom panels) lines was analysed by Western blot. The cells were pretreated with oleate at 0.8 mM, treated with TNF- α (10 ng/ml) or palmitate (0.4 mM) and stimulated with insulin (10 nM). It was normalized against the endogenous level of β -actin.

Cuando se produce la activación de JNK1/2 inducida por TNF- α , se induce la fosforilación en Ser del IRS-1 impidiéndose su fosforilación en Tyr y evitando así la activación de PI3K y la fosforilación de AKT (Fernández-Veledo et al. 2009), y por tanto, generando resistencia a la insulina. Por ello, queríamos comprobar si el oleato al inhibir la activación de JNK1/2 inducida por el TNF- α o el palmitato, podría también reducir la fosforilación en Ser y aumentar la fosforilación en Tyr de IRS-1.

When JNK1/2 is activated by TNF- α , there is an increase in IRS-1 at serine residues, preventing its activating phosphorylation in tyrosine residues through PI3K and Akt pathway (Fernández-Veledo et al. 2009), and, in consequence, generating insulin resistance. For this reason, we wanted to test if the oleate when inhibiting the activation of JNK1/2, induced by TNF- α or the palmitate, could also reduce IRS-1 phosphorylation in Ser and increase IRS-1 phosphorylation in Tyr.

Las células de músculo liso vascular fueron pretratadas con oleato a 0.8 mM durante dos horas previas al tratamiento con TNF- α (10ng/ml, 2 horas) o palmitato (0.4mM, 18 hours). Después, las células fueron estimuladas con insulina a 10 nM durante 5 minutos. A

Vascular smooth muscle cells were pretreated with oleate at 0.8 mM for two hours before a treatment with TNF- α (10ng/ml, 2 hours) or palmitate (0.4mM, 18 hours). Next, the cells were stimulated with insulin at 10 nM for 5 minutes. Then, protein extracts were immu-

continuación, los extractos proteicos se inmunoprecipitaron con IRS-1 y se analizó la fosforilación en los residuos de tirosina y serina de IRS-1 mediante Western blot. El pretratamiento con oleato previno la fosforilación en Ser de IRS-1 producida por el TNF- α o el palmitato, concordando con la reducción de la activación de JNK1/2. Además, el oleato fue capaz de mantener la fosforilación en Tyr de IRS-1 en presencia de TNF- α o palmitato (Figura 5.69).

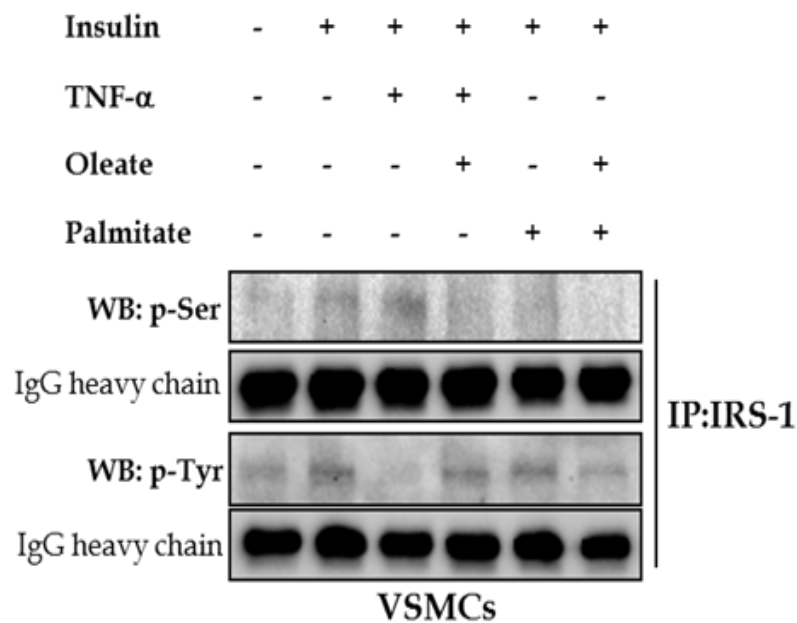


Figura 5.69. Efecto del oleato en la fosforilación de IRS-1 en las VSMCs. Las células fueron pretratadas con oleato (0.8 mM, 2 horas), tratadas con TNF- α (10 ng/ml) o palmitato (0.4 mM, 24 horas) y finalmente, estimuladas con insulina (10 nM, 5 min). Gels representativos de la inmunoprecipitación frente a IRS-1 y análisis por Western blot de la fosforilación en Tyr y en Ser de IRS-1. Normalización frente a la cadena pesada IgG.

Otro de los mecanismos que podría estar modulado por el oleato, podría ser el factor de transcripción nuclear (NF- κ B). Una disminución de su actividad podría reducir la expresión de otros genes implicados en la respuesta inflamatoria y en el estrés, que participan directamente en el proceso aterosclerótico.

El factor de transcripción NF- κ B se encuentra formado por homodímeros o heterodímeros y en su forma inactiva está localizado en el citoplasma de las células unido a la subunidad in-

noprecipitada con IRS-1 and we analysed phosphorylation in the tyrosine and serine residues of IRS-1 by Western blot. The pretreatment with oleate prevented the phosphorylation in Ser of the IRS-1 produced by TNF- α or the palmitate, coinciding with the reduction of JNK1/2 activation. In addition, the oleate was able to maintain IRS-1 phosphorylation in Tyr in presence of TNF- α or palmitate (Figure 5.69).

Figure 5.69. Oleate effect on IRS-1 phosphorylation in VSMCs. The cells were pretreated with oleate (0.8 mM, 2 hours), treated with TNF- α (10 ng/ml) or palmitate (0.4 mM, 24 hours) and finally, stimulated with insulin (10 nM, 5 min). Representative gels of the immunoprecipitation against IRS-1 and analysis by Western blot of the IRS-1 phosphorylation in Tyr and in Ser. Normalization against IgG heavy chain.

Another mechanism that may be modulated by the oleate, could be the nuclear transcription factor (NF- κ B). A diminished activity may reduce the expression of other genes involved in the inflammatory response and in the stress, which directly participate in the atherosclerotic process.

The transcription factor NF- κ B is formed by homodimers or heterodimers and in its inactive form is located in the cytoplasm, and sequestered by its inhibitory subunit, called I κ B- α . It is involved in the response to different stimuli

inhibitoria I κ B- α . Está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, las citoquinas, la radiación ultravioleta, LDL oxidadas y antígenos bacterianos o virales. La activación de NF- κ B se inicia porque la subunidad inhibitoria I κ B- α se fosforila en residuos de serina por el complejo IKK, se ubiquitina y se degrada por el proteosoma, permitiendo la translocación del NF- κ B al núcleo celular para unirse a la región promotora de genes que activa su transcripción (Perkins 2007; Steffan et al. 1995). NF- κ B activa genes que inducen una respuesta fisiológica, como por ejemplo, una respuesta inflamatoria o inmune, una respuesta de supervivencia celular, proliferación y apoptosis. Igualmente, NF- κ B activa la expresión de su propio represor, I κ B- α .

En primer lugar, queríamos comprobar si el TNF- α y el palmitato inducían la activación de NF- κ B y por tanto, la degradación de la subunidad inhibitoria I κ B- α . Para ello, las células de músculo liso vascular fueron tratadas con TNF- α (10 ng/mL) o palmitato (0.4 mM) a diferentes tiempos desde los 10 minutos a las 4 horas y se analizó por Western blot los niveles citosólicos de I κ B- α (Figura 5.70.A). Se observó que tanto el TNF- α , de 10 a 30 minutos, o el palmitato a los 30 minutos eran capaces de disminuir los niveles de I κ B- α , degradándolos y activando al factor de transcripción NF- κ B (Figura 5.70.A). Posteriormente, estudiamos el efecto del oleato sobre la degradación de I κ B- α inducida tanto por el TNF- α como por el palmitato. Las VSMCs fueron pretratadas con oleato a 0.8mM durante 2 horas previas al tratamiento con TNF- α y palmitato durante 30 minutos, y se analizaron por Western blot los niveles de I κ B- α citosólicos. Se observó que el oleato era capaz de reducir la degradación de I κ B- α y por tanto, inhibir la activación de NF- κ B inducida por el TNF- α o el palmitato (Figura 5.70.B). Además, también comprobamos que el oleato a nivel basal no inducía la degradación de I κ B- α , por tanto a diferencia del palmitato, no estaba induciendo la activación de NF- κ B (Figura 5.70.B).

such as stress, cytokines, ultraviolet radiation, oxidized LDL and bacterial or viral antigens. The activation of NF- κ B starts when the inhibitory subunit I κ B- α is phosphorylated in serine residues by the IKK complex, then it is ubiquitinated, and it is degraded by the proteasome. Then, NF- κ B translocates to the nucleus to join the promoter region of activating of transcriptional genes (Steffan et al. 1995; Perkins 2007). NF- κ B activates genes which induce a physiological response like, for instance, an inflammatory or immune response, a cell survival response, proliferation or apoptosis. Likewise, NF- κ B activates the expression of its own repressor, I κ B- α .

In first place, we wanted to verify whether TNF- α and palmitate induced NF- κ B activation and in consequence, the degradation of the inhibitory subunit I κ B- α . For this, vascular smooth muscle cells were treated with TNF- α (10 ng/mL) or palmitate (0.4 mM) during several times (from 10 minutes to 4 hours) and we analysed, by Western blot, the cytosolic levels of I κ B- α (Figura 5.70.A). We observed that TNF- α , from 10 to 30 minutes but the palmitate at 30 minutes, were able to reduce the levels of I κ B- α , by degradation and activating the transcription factor NF- κ B (Figure 5.70.A). Subsequently, we studied the effect of oleate on I κ B- α degradation induced by TNF- α or the palmitate. VSMCs were pre-treated with oleate at 0.8 mM for 2 hours before a treatment with either TNF- α or palmitate during 30 minutes and we analysed cytosolic levels of I κ B- α by Western blot. We observed that the oleate was able to reduce I κ B- α degradation and, therefore, inhibit the NF- κ B activation induced by TNF- α or palmitate (Figure 5.70.B). In addition, we also verified that the oleate at basal level did not induce I κ B- α degradation and indeed, unlike palmitate, oleate was not inducing NF- κ B activation (Figure 5.670B).

En segundo lugar, una vez que vimos que el oleato podría estar previniendo la resistencia a la insulina al reducir la activación de NF- κ B; el siguiente paso, fue estudiar si la inhibición de NF- κ B podría prevenir la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α o el palmitato. Para ello, utilizamos un inhibidor de NF- κ B, el parthenolide. Se ha descrito que dicho compuesto impide que una de la subunidades catalíticas del complejo IKK (IKK β) fosforile a la subunidad inhibitoria I κ B- α , impidiendo la translocación del NF- κ B al núcleo (Sheehan et al. 2002). Lo primero que comprobamos es que el parthenolide a 10⁻⁵ M y durante 90 minutos impedía la degradación de I κ B- α y por tanto, la activación de NF- κ B inducida por el TNF- α o el palmitato (Figura 5.70.B). A continuación, las VSMCs fueron pretratadas con el parthenolide a 10⁻⁵ M durante 90 minutos previos a la estimulación con TNF- α (10ng/ml) o palmitato (0.4mM) durante 30 minutos. Después, se analizó la fosforilación de AKT para valorar si al inhibir el NF- κ B se prevenía la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α o el palmitato. Como hemos mostrado anteriormente, tanto el TNF- α como el palmitato impiden la señalización de la insulina, al reducir la fosforilación de AKT (Thr 308) (Figura 5.70.C). Sin embargo, en presencia del parthenolide se evitó la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α y el palmitato, ya que se observa un aumento en la fosforilación de AKT (T308) (Figura 5.70.C).

Once we noticed that oleate may be preventing insulin resistance by reducing NF- κ B activation, we considered to analyse if NF- κ B inhibition could prevent the insulin resistance induced by TNF- α or palmitate. In order to do this, we used an inhibitor of NF- κ B, the parthenolide. It has been described that this component prevent one of the catalytic subunits of the IKK complex (IKK β) from phosphorylating the inhibitor subunit I κ B- α , avoiding NF- κ B translocation to the nucleus (Sheehan et al. 2002). First, we assessed if parthenolide at 10⁻⁵ M and during 90 minutes prevented I κ B- α degradation and, in consequence, NF- κ B activation induced by TNF- α or palmitate (Figure 5.70.B). Secondly, VSMCs were pretreated with parthenolide at 10⁻⁵ M for 90 minutes before stimulation with TNF- α (10ng/ml) or palmitate (0.4mM) during 30 minutes. Next, we analysed AKT phosphorylation to evaluate if, by inhibiting NF- κ B, it prevented the insulin resistance induced by TNF- α or palmitate. As we demonstrated previously, TNF- α as well as palmitate prevents insulin signalling, by reducing AKT phosphorylation (Thr 308) (Figure 5.70.C). However, in the presence of parthenolide, it avoided insulin resistance induced by TNF- α or palmitate, as we observed an increase of AKT phosphorylation (Thr 308) (Figure 5.70.C).

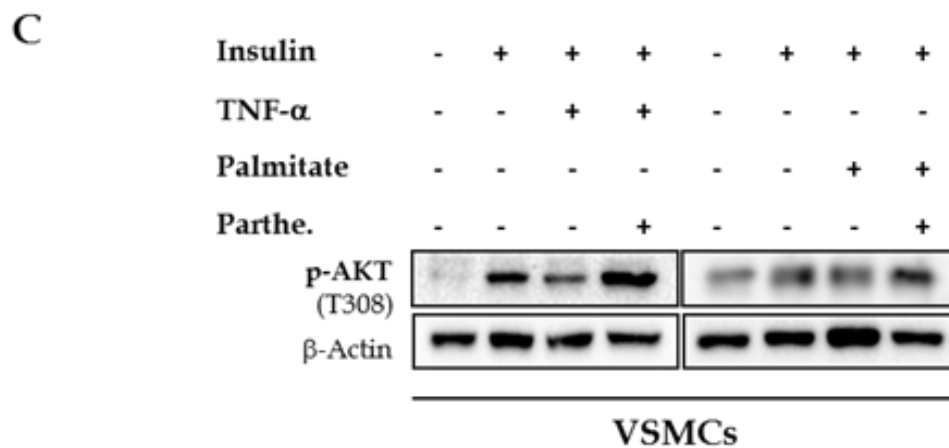
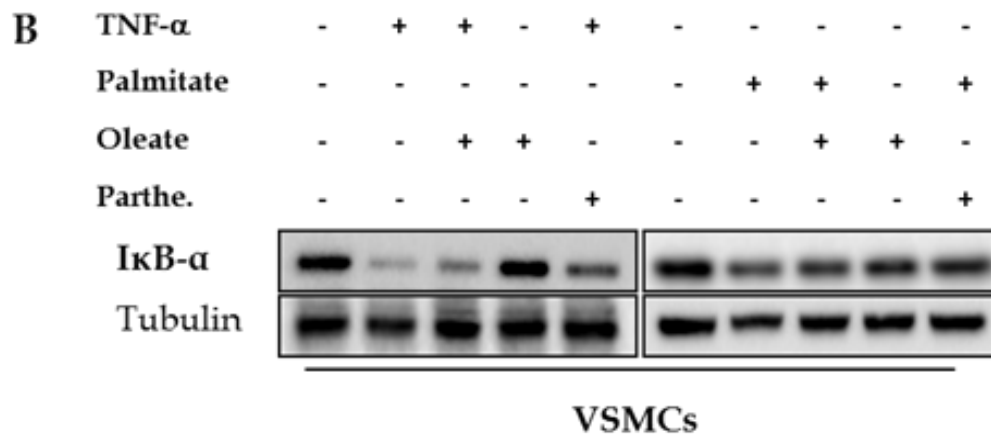
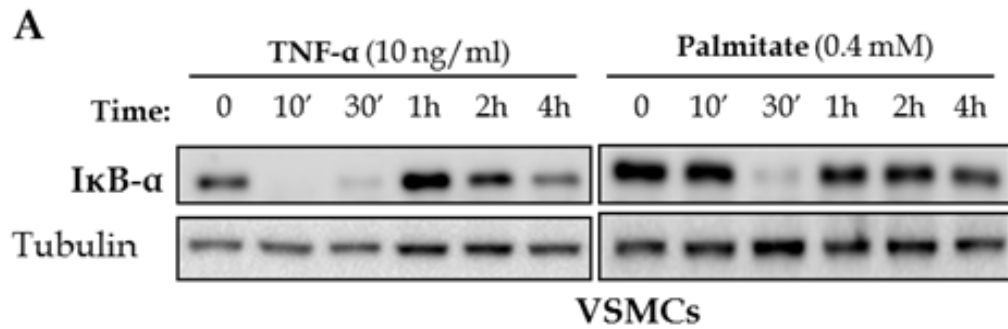


Figura 5.70. El oleato previene la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α y el palmitato por inhibición de la vía canónica del NF- κ B. **A.** Geles representativos de la degradación de I κ B- α inducida por TNF- α o palmitato desde los 10 minutos a las 4 horas. Normalizado frente a la proteína α -tubulina. **B.** Gel representativo del efecto del oleato y del partenolide sobre la degradación de I κ B- α mediante Western blot. Normalizado frente a la proteína α -tubulina. **C.** Gel representativo del efecto del partenolide sobre la fosforilación de AKT (T308) mediante Western blot. Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina.

Figure 5.70. The oleate prevent the insulin resistance induced by TNF- α and palmitate by inhibiting NF- κ B canonic pathway. **A.** Representative gels of the I κ B- α degradation induced by TNF- α or palmitate from 10 minutes to 4 hours. Normalized against the α -tubulin protein. **B.** Representative gel of the effect of oleate and parthenolide on I κ B- α degradation by Western blot. Normalized against the α -tubulin protein. **C.** Representative gel of the effect of parthenolide on AKT (T308) phosphorylation by Western blot. It was normalized against the endogenous level of β -actin.

5.2.10. Efecto protector del oleato en la función y activación endotelial y en la respuesta inflamatoria

Es conocido que durante procesos como la obesidad, la diabetes o la aterosclerosis existe un aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en diferentes tejidos. Se planteó analizar *in vitro*, el efecto de algunas de las citoquinas involucradas en procesos inflamatorios como TNF- α , interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 1-beta (IL-1 β), sobre algunos de los marcadores de disfunción y activación endotelial en las células ECs y el posible efecto protector del oleato frente a estos estímulos.

Anteriormente, relacionamos un posible papel protector de UCP-2 frente a los procesos aterogénicos y la disminución de la expresión UCP-2 con la progresión del daño vascular. Para ello, primero nos planteamos analizar el efecto de TNF- α , IL-6 e IL-1 β sobre la expresión del mRNA de UCP-2 en las células endoteliales. Escogimos trabajar con una dosis de TNF- α a 10ng/ml, puesto que datos previos de nuestro laboratorio, indicaron que era la dosis mínima efectiva en las células vasculares. Para IL-6 e IL-1 β se realizaron curvas para determinar la actividad a la dosis mínima efectiva (entre 5-50 ng/ml, datos no mostrados). Observamos que la dosis mínima efectiva se encontró entre 10 y 15 ng/ml, y así decidimos trabajar con las tres citoquinas proinflamatorias, TNF- α , IL-6 e IL-1 β con la misma dosis de 10 ng/ml.

Las células fueron tratadas con las citoquinas durante 2, 4 y 8 horas y la expresión de UCP-2 fue analizada por qRT-PCR. Se encontró que el tratamiento con TNF- α , IL-6 o IL-1 β disminuyeron de forma significativa la expresión de UCP-2 en las células endoteliales. Esta disminución de la expresión de UCP-2 fue independiente del tiempo (Figura 5.71).

5.2.10. Protector role of the oleate in the endothelial function and activation and in the inflammatory response

It is well-known that during different processes such as obesity, diabetes or atherosclerosis, there is an increase in the levels of pro-inflammatory cytokines in several tissues. We decided to study *in vitro* the effect of various cytokines involved in the inflammatory process, such as TNF- α , interleukin 6 (IL-6), interleukin 1-beta (IL-1 β), on some of the markers of the endothelial dysfunction and activation in ECs and the possible protector effect of the oleate against those stimuli.

Previously, we connected a possible protector role of UCP-2 against atherogenic processes to the reduction of UCP-2 expression with vascular damage progression. For this, first, we decided to analyse the effect of TNF- α , IL-6 and IL-1 β on UCP-2 mRNA expression in endothelial cells. We chose to work with a 10 ng/ml dose of TNF- α , given that previous data from our laboratory indicated that it was the minimum effective dose in vascular cells. For IL-6 and IL-1 β , curves were established in order to assess the activity related to the minimum effective dose (between 5-50 ng/ml, data not presented). We observed the minimum effective dose was found between 10 and 15 ng/ml and therefore we decided to work with the three pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β with the same 10 ng/ml dose.

The cells were pre-treated with cytokines for 2, 4 and 8 hours and the expression of UCP-2 was analysed by qRT-PCR. We found that the treatment with TNF- α , IL-6 and IL-1 β significantly reduced UCP-2 expression in endothelial cells. This decrease of UCP-2 expression was time-independent (Figure 5.71).

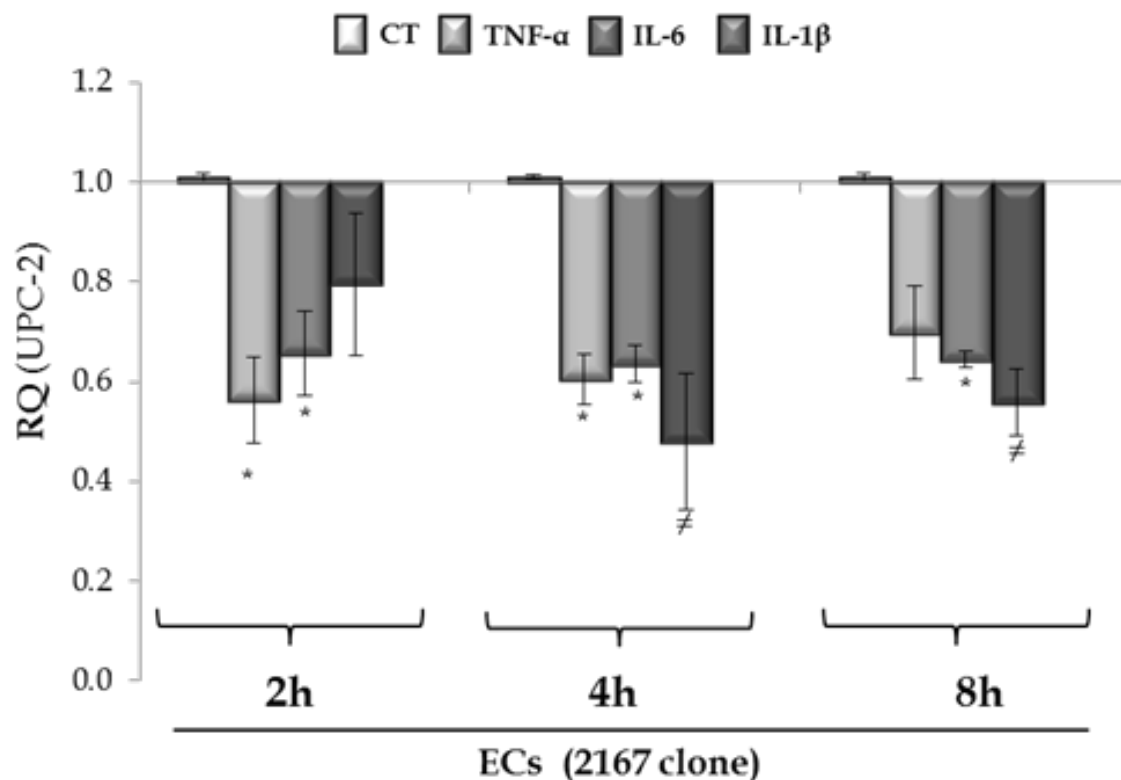


Figura 5.71. Efecto de las citoquinas proinflamatorias en la expresión de UCP-2 en células endoteliales. Se analizó la expresión de UCP-2 en células endoteliales tratadas con TNF- α , IL-6 o IL-1 β durante 2, 4 y 8 horas por qRT-PCR. Los experimentos fueron realizados al menos 3 veces. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.01$ vs. control.

Figure 5.71. Effect of pro-inflammatory cytokines in UCP-2 expression in endothelial cells. UCP-2 expression in endothelial cells treated with TNF- α , IL-6 or IL-1 β during 2, 4 and 8 hours was analysed by qRT-PCR. The experiments were run at least 3 times. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.01$ vs. control.

Anteriormente, se mostró que el oleato aumentaba la expresión de UCP-2 en las células endoteliales y de músculo liso vascular, produciendo un posible efecto protector frente al daño vascular (Figura 5.58). Además, comprobamos también que el oleato era capaz de prevenir la resistencia a la insulina vascular inducida por el TNF- α , a través del aumento de los niveles de UCP-2 pero también al reducir la activación de NF- κ B y JNK1/2. En este contexto, queríamos estudiar que otros efectos protectores, en primer lugar sobre el endotelio vascular, podrían ayudar a explicar los efectos cardiovasculares beneficiosos atribuidos al ácido oleico.

Previously, we demonstrated that oleate increased UCP-2 expression in endothelial and vascular smooth muscle cells, producing a possible protector effect against vascular damage (Figure 5.58). In addition, we confirmed that the oleate was able to prevent vascular insulin resistance induced by TNF- α , through an increase of the levels of UCP-2 but as well by reducing NF- κ B and JNK1/2 activation. In this context, we wanted to study other protector effects, first on the vascular endothelium, that may explain the beneficial cardiovascular effects attributed to oleic acid.

En primer lugar, estudiamos el efecto del oleato en la prevención de la disfunción vascular. Para ello, la ECs fueron tratadas con las citoquinas proinflamatorias, TNF- α , IL-6 e IL-1 β

First of all, we studied the effect of oleate in preventing vascular dysfunction. To do this, ECs were treated with pro-inflammatory cytokines, TNF- α , IL-6 and IL-1 β (10ng/ml) during 2, 4 and 8 hours and we analysed eNOS mRNA expression by qRT-PCR. We observed that the treatment with IL-1 β significantly re-

(10ng/ml) durante 2, 4 y 8 horas y se analizó la expresión del mRNA de la eNOS por qRT-PCR. Se observó que el tratamiento con IL-1 β disminuyó significativamente los niveles de eNOS de forma independiente del tiempo. Sin embargo, el TNF- α y la IL-6 disminuyeron significativamente los niveles de eNOS sólo a las dos horas. Esta reducción de la expresión de eNOS fue corregida por el tratamiento con el oleato (Figura 5.72). Así, el ácido oleico podría mejorar y prevenir la disfunción endotelial.

duced the levels of eNOS independently of the time. Nonetheless, TNF- α and IL-6 significantly decreased eNOS levels only at 2 hours. This reduction in eNOS expression was corrected with the treatment with oleate (Figure 5.72). Thus, oleic acid might improve and prevent endothelial dysfunction.

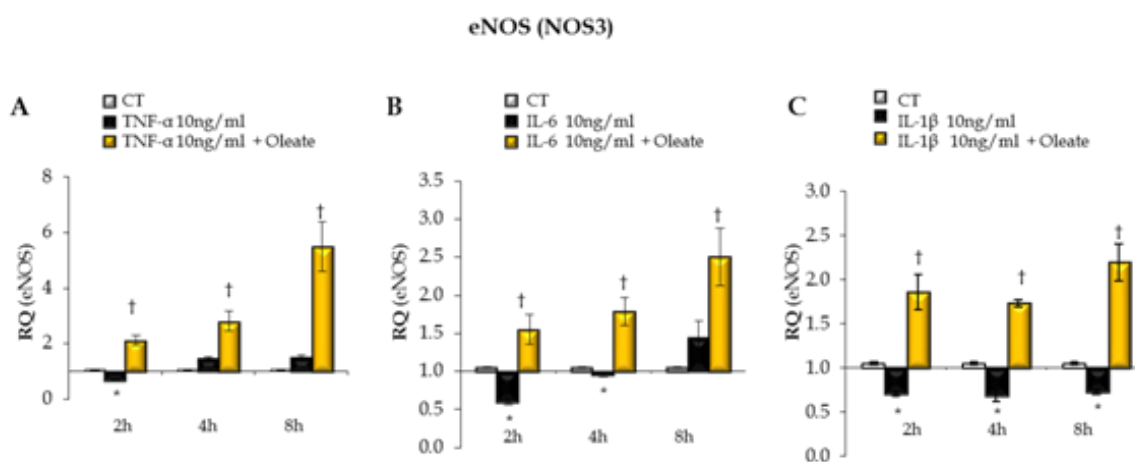


Figura 5.72. Efecto protector del oleato en la función endotelial. Se analizó el efecto protector del oleato (0.4 mM) sobre la expresión de eNOS en las células endoteliales estimuladas con las citoquinas proinflamatorias, TNF- α (A), IL-6 (B) o IL-1 β (C). * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. estímulo.

Figure 5.72. Protector effect of oleate in endothelial function. The protector effect of oleate (0.4 mM) on eNOS expression was analysed in endothelial cells stimulated with pro-inflammatory cytokines, TNF- α (A), IL-6 (B) or IL-1 β (C). * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. stimuli.

Un vez que el endotelio es disfuncional, se alteran sus propiedades y se activa, aumentando la producción de factores quimiotácticos y moléculas de adhesión que induzcan el reclutamiento inflamatorio y su entrada en el espacio subendotelial y así, favoreciendo la progresión del proceso aterosclerótico. Con el objetivo de conocer si el ácido oleico además de mejorar la disfunción endotelial, era capaz de reducir la activación endotelial y el reclutamiento inflamatorio, analizamos el efecto del ácido oleico en la expresión de ICAM-1, como molécula de adhesión, y MCP-1, como proteína quimioattractante de monocitos, inducidas por las citoquinas proinflamatorias. Para el desarrollo de este objetivo, las células endoteliales fueron pretratadas con oleato (0.4

Once the endothelium is dysfunctional, its properties are altered and it activates an increase of the production of chemotactic factors and from adhesion molecules which induce the recruitment of inflammatory components and its entry in the endothelial space, therefore facilitating the progression of the atherosclerotic process. With the aim of assessing if oleic acid, on top of ameliorating endothelial dysfunction, was able to reduce endothelial activation and the recruitment of inflammatory components, we analysed the effect of oleic acid in ICAM-1 expression, as an adhesion molecule, and MCP-1, as monocytes chemoattractant protein, induced by pro-inflammatory cytokines. To do this, the endothelial cells were pre-treated with oleate (0.4 mM) during two

mM) durante dos horas y estimuladas con el TNF- α , IL-6 o IL-1 β (10ng/ml), durante 2, 4 y 8 horas. Finalmente, la expresión del mRNA de ICAM-1 y MCP-1 fueron analizados por qRT-PCR (Figura 5.73).

Se observó que las células tratadas con TNF- α , IL-6 e IL-1 β aumentaron significativamente los niveles del mRNA de ICAM-1. Aunque, el aumento más drástico de ICAM-1 se presentó con la estimulación con el TNF- α . Además, el oleato redujo de forma significativa la expresión de ICAM-1 inducida por las tres citoquinas proinflamatorias a todos los tiempos estudiados (Figura 5.73).

hours and stimulated with TNF- α , IL-6 or IL-1 β (10ng/ml) for 2, 4 and 8 hours. Eventually, ICAM-1 and MCP-1 mRNA expressions were analysed by qRT-PCR (Figure 5.73).

We observed that the cells treated with TNF- α , IL-6 e IL-1 β significantly increased ICAM-1 mRNA levels. ICAM-1 most dramatic increase was observed in reaction to TNF- α stimulation. On the other hand, the oleate significantly reduced ICAM-1 expression induced by the three pro-inflammatory cytokines at all the studied times (Figure 5.73).

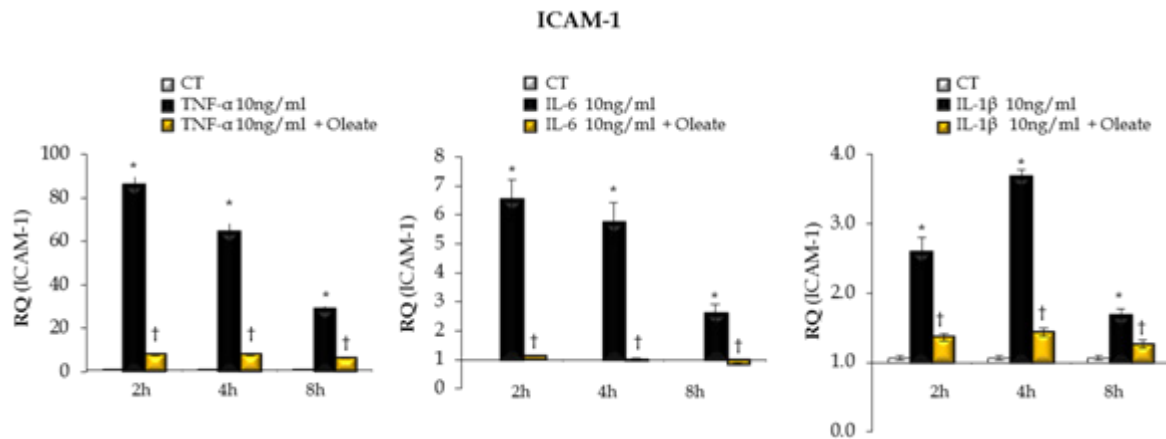


Figura 5.73. Efecto protector del oleato en la activación endotelial. Se analizó el efecto protector de oleato (0.4 mM) sobre la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales estimuladas con las citoquinas proinflamatorias, TNF- α (A), IL-6 (B) o IL-1 β (C). * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. estímulo.

Figure 5.73. Protector effect of oleate in endothelial activation. The protector effect of oleate (0.4 mM) on ICAM-1 expression was analysed in endothelial cells stimulated with pro-inflammatory cytokines, TNF- α (A), IL-6 (B) or IL-1 β (C). * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. stimuli.

A continuación estudiamos el efecto del oleato en la expresión de MCP-1 en células endoteliales estimuladas con las citoquinas proinflamatorias. Se observó que las células tratadas con TNF- α , IL-6 e IL-1 β aumentaron significativamente los niveles del mRNA para MCP-1, alcanzando la máxima expresión a las 2 horas. La expresión de MCP-1 inducida por el TNF- α e IL-6 se mantuvo a lo largo del tiempo. Sin embargo, el efecto de la IL-1 β sobre la expresión de MCP-1, parece ser de forma aguda, puesto que los niveles no se incrementan por la exposición durante tiempos más prolongados. Más importante aún, el pretratamiento con oleato redujo de forma significativa la expresión de

Next, we studied the effect of oleate on MCP-1 expression in endothelial cells stimulated with pro-inflammatory cytokines. We observed that the cells treated with TNF- α , IL-6 or IL-1 β significantly increased the levels of MCP-1 mRNA, reaching the maximum expression at 2 hours. MCP-1 expression induced by TNF- α and IL-6 were maintained over time. Nevertheless, the effect of IL-1 β on MCP-1 expression seems to be acute given that the levels did not increase after an exposition at more prolonged times. Even more important, the pretreatment with oleate significantly reduced MCP-1 expression induced by the pro-inflammatory cytokines in the endothelial cells (Figure 5.74).

MCP-1 inducida por las citoquinas proinflamatorias en las células endoteliales (Figura 5.74).

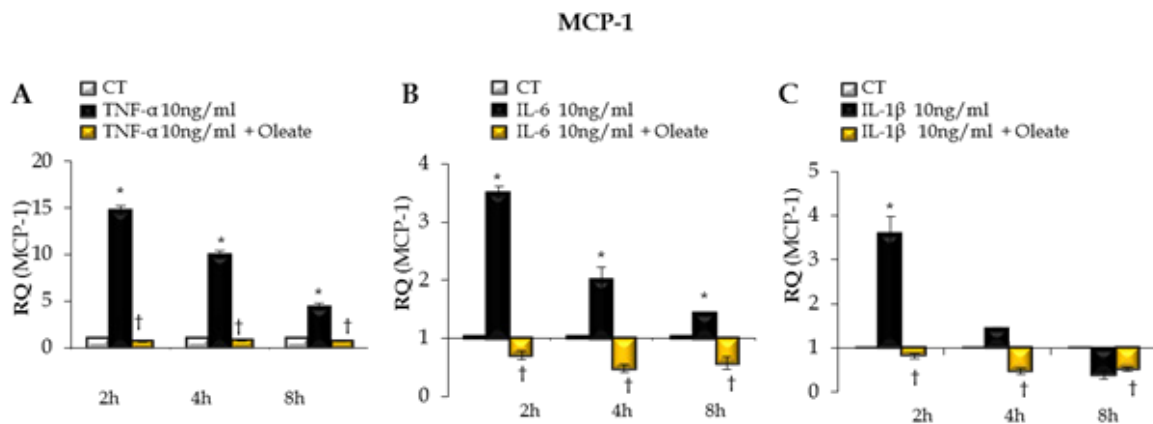


Figura 5.74. Efecto protector del oleato en el reclutamiento inflamatorio. Se analizó el efecto protector de oleato (0.4 mM) sobre la expresión de MCP-1 en las células endoteliales estimuladas con las citoquinas proinflamatorias, TNF- α (A), IL-6 (B) o IL-1 β (C). * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. estímulo.

Figure 5.74. Protector effect of oleate in the recruitment of inflammatory components. The protector effect of oleate (0.4 mM) on MCP-1 expression was analysed in endothelial cells stimulated with pro-inflammatory cytokines, TNF- α (A), IL-6 (B) or IL-1 β (C). * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. stimuli.

5.2.11. Efecto protector del oleato en la viabilidad celular

Se estudió la viabilidad celular inducida por oleato en las células endoteliales y células de músculo liso vascular. Para ello, el medio de mantenimiento fue remplazado por medio sin suero durante toda la noche. Esto se realizó con el fin de detener el ciclo celular, y asegurar que todas las células estuvieran en la misma fase en el momento de la estimulación. Al día siguiente, las células fueron tratadas con diferentes dosis de oleato a 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM, durante 2, 12 y 24 horas. Posteriormente las células viables, fueron teñidas con cristal violeta y disueltas en SDS (1X) como se explica en materiales y métodos (sección 3.9.3). Finalmente, se leyeron las absorbancias por espectrofotometría. Se observó que el oleato no alteraba la viabilidad celular, ni afectó a la proliferación celular en ninguno de los dos tipos celulares (Figura 5.75).

5.2.11. Protector effect of the oleate in cellular viability

We studied the cellular viability induced by oleate in endothelial and vascular smooth muscle cells. In order to do this, the maintenance media was replaced by a media without serum during all night. This was done with the aim at stopping the cellular cycle and make sure that all cells would be in the same phase when the stimulation would occur. On the next day, the cells were treated with various doses of oleate at 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mM for 2, 12 and 24 hours. Subsequently, the viable cells were stained with crystal violet and dissolved in SDS (1X) as explained in materials and methods (section 3.9.3). Finally, the absorbances were read by spectrophotometry. We observed that the oleate neither alter cellular viability nor affected cell proliferation in none of the two cells types (Figure 5.75).

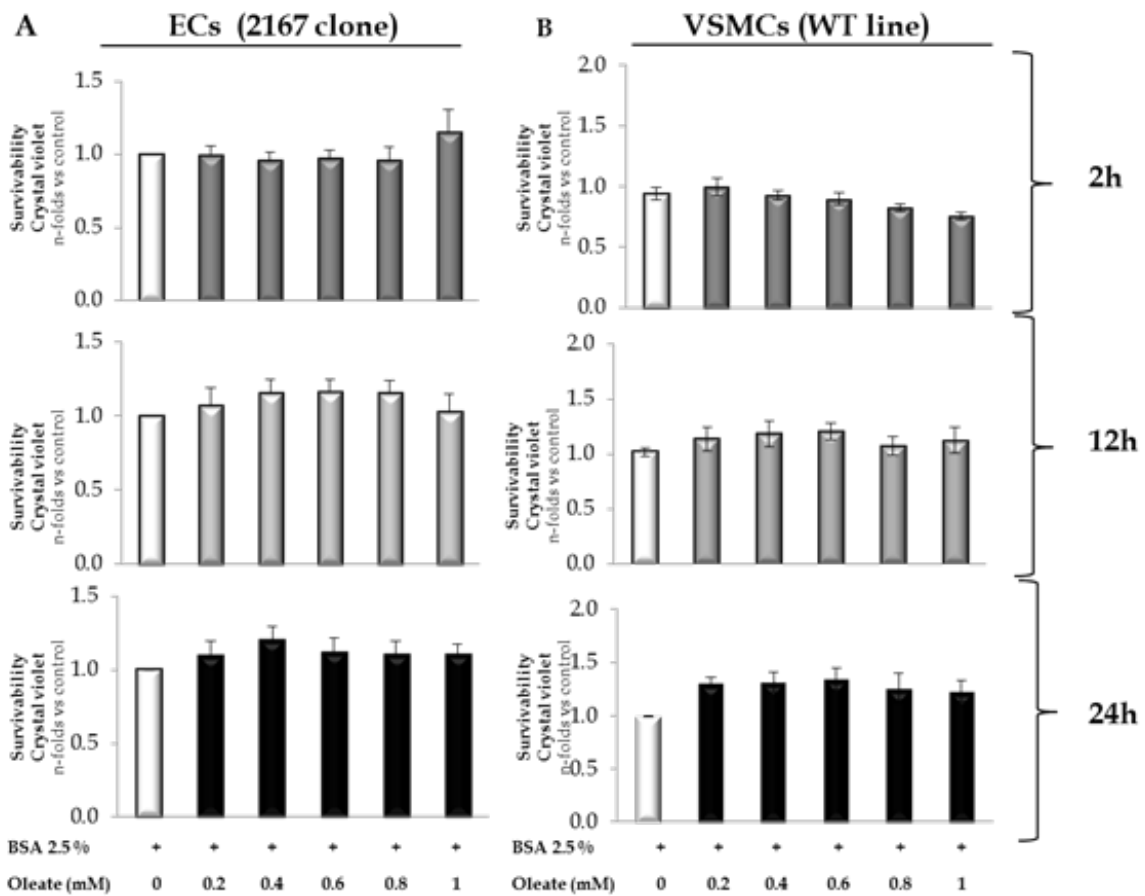


Figura 5.75. Viabilidad celular inducida por oleato. Se analizó la viabilidad celular por coloración con cristal violeta. Las células endoteliales (ECs) y las células de músculo liso vascular (VSMCs) fueron estimuladas con oleato a 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM, durante 2, 12 y 24 horas.

Figure 5.75. Cellular viability induced by the oleate. Cellular viability was analysed by staining with crystal violet. Endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs) were stimulated with oleate at 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mM, during 2, 12 and 24 hours.

Igualmente, se estudió la viabilidad inducida por palmitato en las células endoteliales y las células de músculo liso vascular tipo silvestre. Después de una noche sin suero, cuando las células se encontraban todas en la misma fase del ciclo celular, tratamos con diferentes dosis de palmitato a 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM, durante 2, 12 y 24 horas. Posteriormente, las ECs y VSMCs fueron teñidas con cristal violeta y se disolvió en SDS. Finalmente, se leyó las absorbancias por espectrofotometría. Se observó que a 2 y 12 horas, el palmitato a ninguna dosis produjo cambios significativos sobre la viabilidad de las células endoteliales. Sin embargo, a las 24 horas y de forma dependiente de la dosis, el palmitato redujo de forma significativa la viabilidad celular. El tratamiento con palmi-

Likewise, we studied the viability induced by palmitate in endothelial cells and wild type vascular smooth muscle cells. After one night without serum, when the cells were in the same phase of the cellular cycle, we treated them with several doses of palmitate at 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mM, during 2, 12 y 24 hours. Next, ECs and VSMCs were stained with crystal violet and dissolved in SDS. Finally, we read the absorbances by spectrophotometry. We observed that at 2 and 12 hours, palmitate did not produce at any dose significant changes on viability in endothelial cells. However at 24 hours and depending on the dosage, palmitate produced a significant decrease of cellular viability. The treatment with palmitate at 1 mM for 24 hours reduced in a 50% range the via-

tato 1mM durante 24 horas redujo en un 50% la viabilidad de las células endoteliales (Figura 5.76). Por otro lado, en las células de músculo liso vascular, el palmitato parece tener el efecto contrario, aumentando de forma significativa la viabilidad celular a las 2, 12 y 24 horas. Los aumentos más significativos de la viabilidad celular de las VSMCs fueron los inducidos por el palmitato entre 0.4 y 1 mM (Figura 5.76).

bility of endothelial cells (Figure 5.76). On the other hand, in vascular smooth muscle cells, palmitate seems to have the opposite effect, increasing significantly cellular viability at 2, 12 and 24 hours. The more significant increases of cellular viability in VSMCs were induced by a dose of palmitate at 0.4 and 1 mM (Figure 5.76).

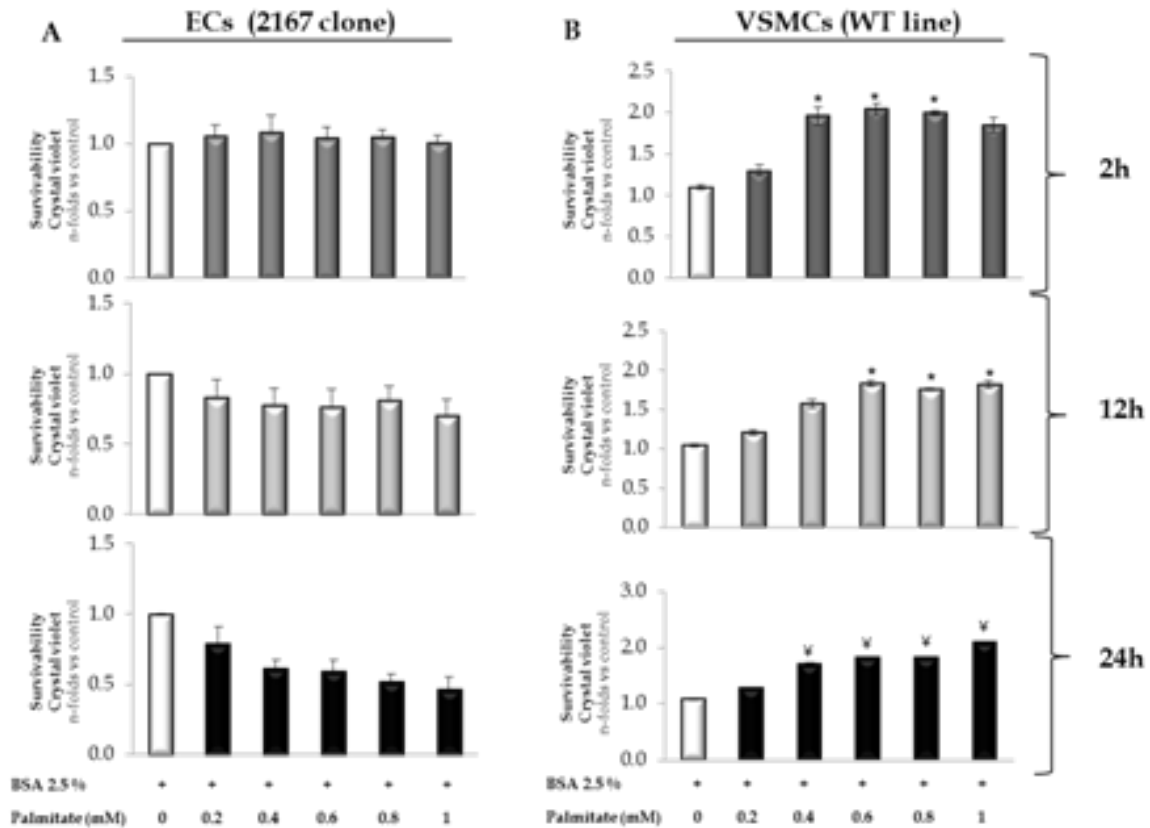


Figura 5.76. Viabilidad celular inducida por palmitato. Se analizó la viabilidad celular por coloración con cristal violeta. Las células endoteliales (ECs) y las células de músculo liso vascular (VSMCs) fueron estimuladas con palmitato a 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM, durante 2, 12 y 24 horas.

Figure 5.76. Cellular viability induced by the palmitate. Cellular viability was analysed by staining with crystal violet. Endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs) were stimulated with oleate at 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mM, during 2, 12 and 24 hours.

5.2.12. Efecto protector del oleato en la proliferación de las células de músculo liso vascular

Uno de los factores que contribuye al crecimiento de la placa aterosclerótica durante las primeras fases del proceso es la migración y proliferación de las VSMCs. Por ello, una vez analizada la viabilidad celular de ambos ácidos grasos en las VSMCs, creíamos que podría ser de gran interés estudiar el efecto del oleato sobre la proliferación inducida por el palmitato, así como la inducida por algunos estímulos proaterogénicos como el TNF- α y la angiotensina II (AngII). Las VSMCs fueron pretratadas con oleato a 0.8 mM durante dos horas, y estimuladas con TNF- α (10ng/ml), Ang II (10⁻⁶ M) o palmitato (0.4mM) durante 24 horas.

Se observó que las células pretratadas con oleato presentaban una disminución significativa de la proliferación inducida por el TNF- α , Ang II o palmitato. Sin embargo, la reducción con el tratamiento con oleato fue mucho más drástica en las células tratadas con palmitato (Figura 5.77).

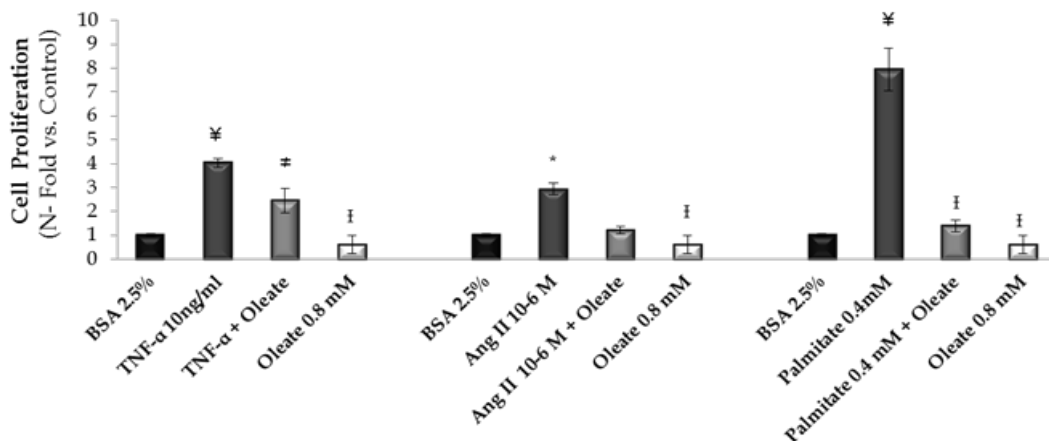


Figura 5.77. Efecto protector del oleato en la proliferación de las VSMCs. Se realizaron los experimentos de proliferación celular en el contador celular CASY. Las VSMCs fueron estimuladas con TNF- α (10 ng/ml), Ang II (10⁻⁶ M) y palmitato (0.4 mM) con y sin pre-tratamiento con oleato (0.8 mM, 2 horas). Todos los experimentos fueron realizados al menos 4 veces. * p <0.05 vs. cada control; ‡ p <0.01 vs. BSA 2.5%; † p <0.01 vs. estímulo; † p <0.05 vs. estímulo.

5.2.12. Protector effect of the oleate in the proliferation of vascular smooth muscle cells

One of the factors that contribute to the growth of atherosclerotic plaque during the first phases of the process is the migration and proliferation of VSMCs. For this, once analysed the cellular viability of both fatty acids in VSMCs, we thought it could be really interesting to study the effect of the oleate on the proliferation induced by the palmitate, as well as the proliferation induced by some proatherogenic stimuli, such as TNF- α and angiotensin II (Ang II). VSMCs were pretreated with oleate at 0.8 mM for two hours and stimulated with TNF- α (10ng/ml), Ang II (10⁻⁶ M) or palmitate (0.4mM) during 24 hours.

We observed that cells pretreated with oleate, presented a significant reduction of the proliferation induced by TNF- α , Ang II or palmitate. Nonetheless, the reduction related to the treatment with oleate was much more dramatic in the cells treated with palmitate (Figure 5.77).

Figure 5.77. Protector effect of oleate in VSMCs proliferation. Cell proliferation experiments were run in the CASY cells counter. VSMCs were stimulated with TNF- α (10 ng/ml), Ang II (10⁻⁶ M) and palmitate (0.4 mM) with and without pretreatment with oleate (0.8 mM, 2 hours). All the experiments were run at least 4 times. * p <0.05 vs. each control; ‡ p <0.01 vs. BSA 2.5%; † p <0.01 vs. stimuli; † p <0.05 vs. stimuli.

5.2.13. Efecto protector del oleato en la apoptosis de las células de músculo liso vascular

Uno de los mecanismos descritos que se ha implicado directamente en la inestabilidad y ruptura de las placas ateroscleróticas ha sido el aumento de la apoptosis de las VSMCs que forman la cápsula fibrosa, debilitándola y desencadenando el evento agudo (Martin-Ventura 2004; Harari & Liao 2010; Khatib & Vaya 2014). Por ello, otro de los objetivos de este trabajo además de ver el papel protector del ácido oleico sobre el crecimiento de la placa, era estudiar si el ácido oleico podía afectar y mejorar la estabilidad de la misma reduciendo la apoptosis de las VSMCs.

Previamente, hemos demostrado que el oleato tenía un efecto positivo sobre el control de la proliferación inducida por TNF- α en las células de músculo liso vascular. Además, es bien conocido que el TNF- α es inductor de la apoptosis en muchos sistemas celulares (Fan 2014). Algunos autores han planteado que el TNF- α es capaz de activar dos mecanismos opuestos, como los mecanismos de supervivencia celular y de muerte celular de forma simultánea (Rath & Aggarwal 1999). Se planteó verificar si el TNF- α en las VSMCs era capaz de activar ambos mecanismos de forma simultánea.

Por tanto, hemos mostrado previamente que el TNF- α indujo la proliferación de las VSMCs. A continuación, estudiamos si el TNF- α induce muerte celular y si el pretratamiento con oleato podría mejorar el perfil inducido por el TNF- α en las VSMCs. El análisis el ciclo celular de las VSMCs se realizó por citometría de flujo, descrito en el apartado de materiales y métodos (sección 3.9.1). Las VSMCs fueron pretratadas durante 2 horas con oleato a 0.4 mM y estimuladas con TNF- α a 10ng/ml durante 24 horas. En primer lugar, se observó que el tratamiento con el TNF- α aumentó de forma significativa el porcentaje de células en

5.2.13 Protector effect of the oleate in the apoptosis of vascular smooth muscle cells

One of the described mechanisms, which are directly involved in the inestability and rupture of atherosclerotic plaques, is the increase of the apoptosis of VSMCs which form the fibrous cap, weakening it and triggering the acute event (Martin-Ventura 2004; Harari & Liao 2010; Khatib & Vaya 2014). For this reason, another objective of this work, on top of studying the protector role of the oleic acid on the plaque growth, was to study if the oleic acid could affect and improve the plaque stability thus reducing the VSMCs apoptosis

Previously, we demonstrated that oleate had a positive effect on the control of the proliferation induced by TNF- α in vascular smooth muscle cells. On top of that, it is well known that TNF- α is an inducer of apoptosis in numerous cellular systems (Fan 2014). Some authors contemplated the possibility that TNF- α is able to activate two opposite mechanisms, such as survival and cell death mechanism simultaneously (Rath & Aggarwal 1999). We decided to confirm if TNF- α in VSMCs was able to activate simultaneously both mechanisms.

As a reminder, we previously demonstrated that TNF- α induced VSMCs proliferation. In this part, we study if TNF- α induces cell death and if a pretreatment with oleate could improve the profile induced by TNF- α in VSMCs. The analysis of the cellular cycle in VSMCs was done by flow cytometry, as described in the materials and methods part (section 3.9.1). The VSMCs were pretreated during 2 hours with oleate at 0.4 mM and stimulated with TNF- α at 10ng/ml for 24 hours. First, we observed that the treatment with TNF- α significantly increased the percentage of cells in G0/G1 phase in comparison to the control. In addition, the oleate per se does not alter the cellular cycle in VSMCs. Even more impor-

fase G0/G1 con respecto al control. Además, el oleato per sé no altera el ciclo celular de las VSMCs. Más importante aún, el pre-tratamiento con oleato redujo de forma significativa el porcentaje de células apoptóticas inducido por el TNF- α (Figura 5.78).

tant, the pre-treatment with oleate significantly reduced the percentage of apoptotic cells induced by TNF- α (Figure 5.78).

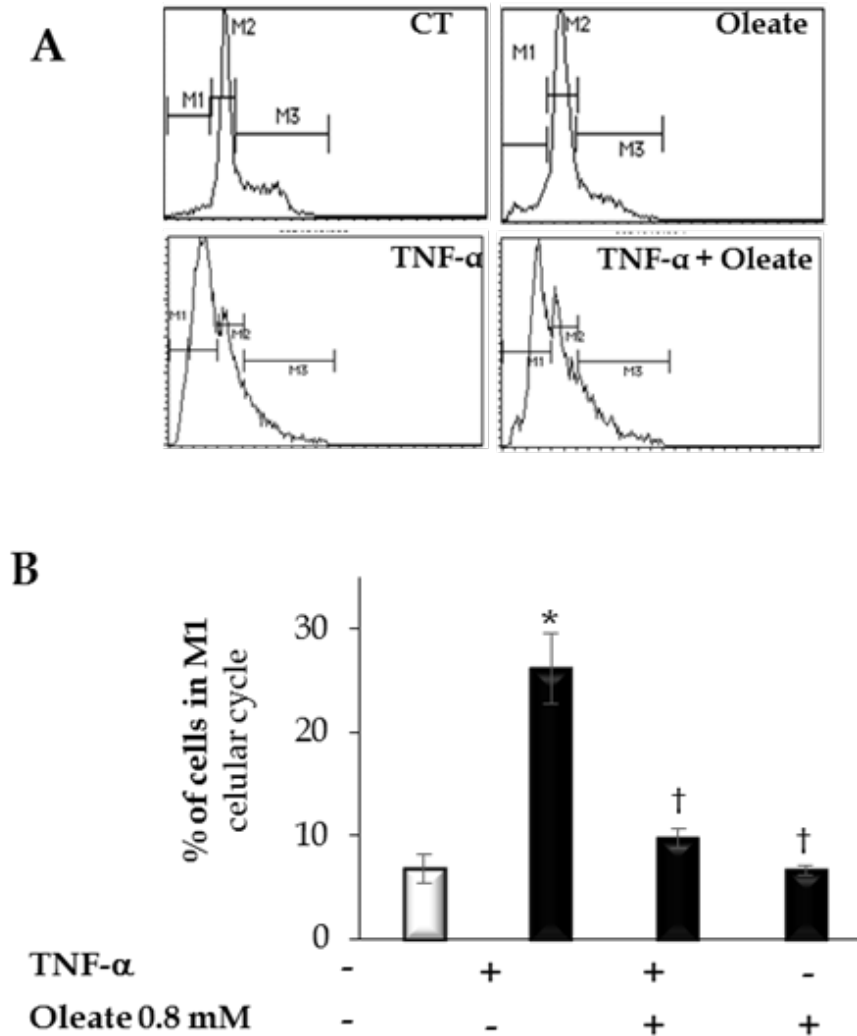


Figura 5.78. El oleato disminuye la apoptosis inducida por TNF- α en VSMCs. Se analizó el papel del oleato sobre la apoptosis inducida por TNF- α en las células de músculo liso vascular (VSMCs) por incorporación del yoduro de propidio en el ciclo celular por citometría de flujo. Las células fueron pretratadas con oleato a 0.8 mM durante 2 horas previas al tratamiento con TNF- α durante 24 horas. Los experimentos fueron realizados al menos cuatro veces. **A.** Histogramas representativos de ciclo celular: Control, TNF- α , TNF- α + oleato y oleato. **B.** Gráfico de barras del porcentaje de células en fase G0/G1 del ciclo celular. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. TNF- α .

Figure 5.78. The oleate decreases the apoptosis induced by TNF- α in VSMCs. The role of oleate on the apoptosis induced by TNF- α was analysed in vascular smooth muscle cells (VSMCs) by incorporation of propidium iodide in the cellular cycle by flow cytometry. The cells were pretreated with oleate at 0.8 mM during 2 hours before a treatment with TNF- α during 24 hours. The experiments were run at least 4 times. **A.** Cellular cycle representative histograms: Control, TNF- α , TNF- α + oleate and oleate. **B.** Bar graph of the percentage of cells in the G0/G1 phase of cellular cycle. * $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. TNF- α .

Para continuar estudiando el efecto protector del oleato en la apoptosis de las células de músculo liso vascular, se analizaron también los niveles proteicos de caspasa 3 activa inducida por diferentes estímulos. Como control negativo de la muerte celular se utilizaron las células sin ningún tratamiento en presencia de suero. Como control positivo de apoptosis se utilizó la thapsigargina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 minutos. La thapsigargina es un inhibidor no competitivo de las enzimas SERCA (sarco/retículo endoplásmico Ca^{2+} ATPasa), que induce estrés en el retículo endoplásmico.

En primer lugar, las células VSMCs fueron pretratadas con oleato a 0.8mM durante dos horas y posteriormente estimuladas con $\text{TNF-}\alpha$ a 10ng/ml. Se observó que la thapsigargina indujo una alta expresión de la caspasa 3 activa. Igualmente, el $\text{TNF-}\alpha$ aumentó la expresión de caspasa 3 en comparación al control, aunque esta expresión fue mucho menor que la inducida por la thapsigargina. Finalmente, se observó que oleato logró disminuir la expresión de caspasa 3 inducida por $\text{TNF-}\alpha$ (Figura 5.79.A).

En vista que el oleato presentó un efecto protector frente a la apoptosis inducida por $\text{TNF-}\alpha$, al reducir los niveles de caspasa 3 activa, nos planteamos estudiar el efecto del oleato sobre la apoptosis inducida por thapsigargina o por la combinación thapsigargina-palmitato. Se observó que el oleato redujo los niveles proteicos de la caspasa 3 activa inducida por thapsigargina (Figura 5.79.B). Por otro lado, ni el palmitato ni el oleato per sé indujeron la expresión de caspasa 3 activa. Aunque anteriormente, se había mostrado que el palmitato es un ácido graso que aumenta la viabilidad y proliferación de las VSMCs, no presentó ningún efecto protector sobre la expresión de caspasa 3 activa inducida por thapsigargina. Sin embargo, el oleato fue capaz de reducir de forma parcial la apoptosis inducida por thapsigargina en combinación con palmitato (Figura 5.79.B).

To further studying the protector effect of the oleate in the apoptosis vascular smooth muscle cells, we analysed as well the protein levels of active caspase-3 induced by several stimuli. As a negative control of cell death, we used the same cells without any treatment in presence of serum. As a positive control of apoptosis, we used thapsigargin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) during 30 minutes. The thapsigargin is a non competitive inhibitor of the SERCA enzymes (sarco/plasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) which induces stress in the endoplasmic reticulum.

First, the VSMCs were pretrated with oleate at 0.8 mM during two hours and then stimulated with $\text{TNF-}\alpha$ at 10 ng/ml. We observed that thapsigargin induced a high expression of active caspase-3. Similarly, $\text{TNF-}\alpha$ increased the expression of caspase-3 in comparison to the control, although this expression was lower than the one induced by thapsigargin. Finally, we observed that oleate reduced the expression of caspase-3 induced by $\text{TNF-}\alpha$ (Figure 5.79.A).

Seeing that oleate had a protector effect against the apoptosis induced by $\text{TNF-}\alpha$, by reducing the levels of active caspase-3, we decided to study the effect of oleate on the apoptosis induced by thapsigargin or by the combination thapsigargin-palmitate. We observed that oleate reduced the protein levels of caspase-3 induced by thapsigargin (Figure 5.79.B). On the other hand, neither the palmitate, nor oleate per se induced the expression of active caspase-3. Although it had previously been demonstrated that palmitate is a fatty acid which increases viability and proliferation in VSMCs, did not show any protector effect on the expression of active caspase-3 induced by thapsigargin. Nevertheless, oleate was able to partially reduce the apoptosis induced by thapsigargin in combination with palmitate (Figure 5.79.B).

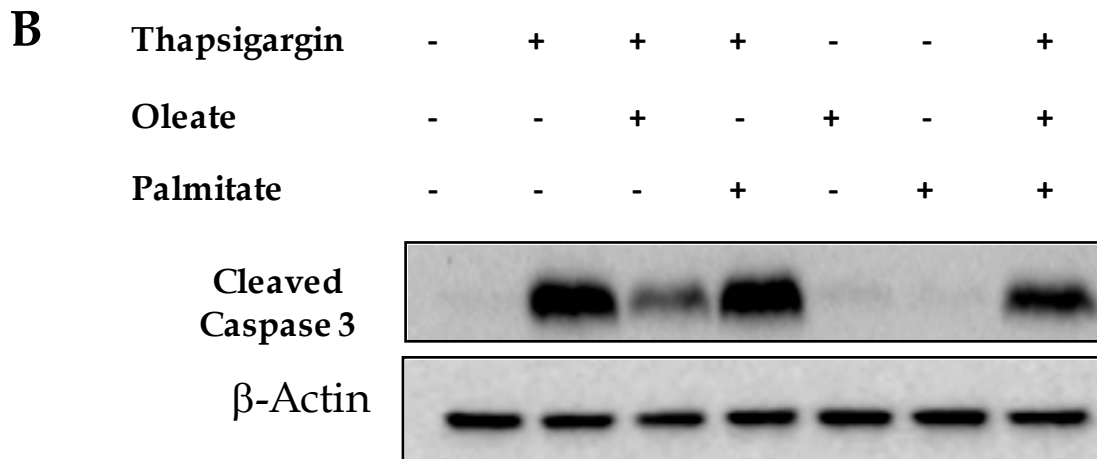
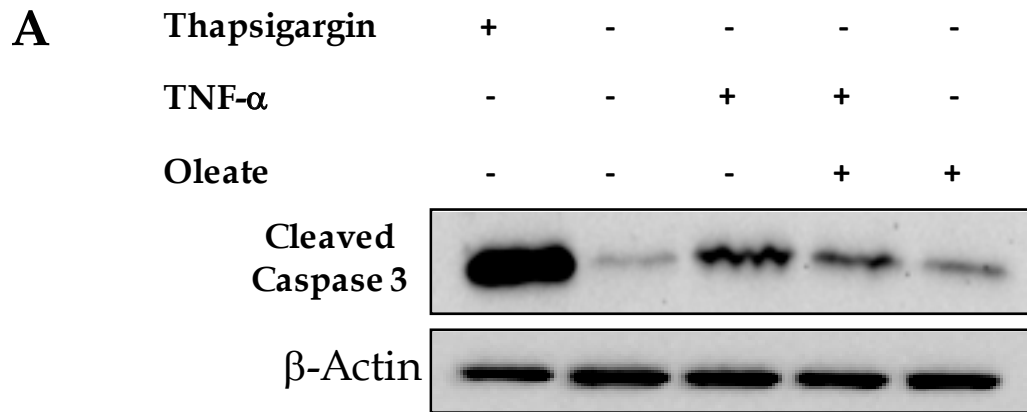


Figura 5.79. Efecto del oleato sobre los niveles de caspasa 3 activa en las células de músculo liso vascular. Se analizó la apoptosis en las VSMCs mediante un Western blot frente a la caspasa 3 activa. A. Geles representativos del efecto protector del oleato en la apoptosis inducida por TNF- α . Se utilizó como control negativo de apoptosis las células sin deprivar y como control positivo de apoptosis las células tratadas con tapsigargina. Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. B. Geles representativos del efecto protector del oleato en la apoptosis inducida por tapsigargina. Ninguno de los dos ácidos grasos estudiados indujo apoptosis, pero sólo el palmitato fue capaz de reducir la apoptosis inducida por la tapsigargina. Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina.

Figure 5.79. Effect of oleate on the levels of active caspase-3 in vascular smooth muscle cells. VSMCs Apoptosis was analysed by a Western blot against active caspase-3. A. Representative gels of the protector role of oleate in apoptosis induced by TNF- α . As a negative control of apoptosis, non-deprived cells were used and as a positive control of apoptosis, cells treated with thapsigargin. It was normalized against the endogenous level of β -actin. B. Representative gels of protector effect of oleate in VSMCs apoptosis induced by thapsigargin. None of the studied fatty acids induced apoptosis, but the palmitate only was able to reduce the apoptosis induced by thapsigargin. It was normalized against the endogenous level of β -actin.

5.2.14. Efecto protector del oleato en la trombogénesis vascular

El inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) es una serín-proteasa, siendo el principal inhibidor del activador tisular del plasminógeno (tPA) y la uroquinasa (uPA). PAI-1 es un inhibidor por tanto de la fibrinólisis. Altos niveles de PAI-1 en sangre son un factor de riesgo para la enfermedad trombótica (Vicent et al. 2003).

Para estudiar la inducción de la expresión proteica de PAI-1 por TNF- α en las VSMCs, realizamos unas curvas de tiempo, donde estimulamos a las VSMCs con TNF- α a 10 ng/ml desde 10 minutos hasta 24 horas. Se observó que el TNF- α induce la expresión de PAI-1 entre las 18 y 24 horas en las VSMCs (Figura 5.80.A). A continuación, decidimos explorar el efecto del oleato sobre la producción de PAI-1 inducida por TNF- α en las VSMCs. En primer lugar, se observó que el oleato per se no aumentaba los niveles proteicos de PAI-1 y además, era capaz de reducir de forma significativa los niveles proteicos de PAI-1 inducidos por el TNF- α (Figura 5.80.B). Finalmente, queríamos ver si el TNF- α podría estar aumentando la producción de PAI-1 en VSMCs a través de la activación de NF- κ B. Para ello, pretratamos a las células con el parthenolide, inhibidor de la activación de NF- κ B, durante 90 minutos previos a la estimulación con el TNF- α a 10ng/ml durante 24 horas. Se observó que al inhibir la vía del NF- κ B se reducía parcialmente la producción de PAI-1 en las VSMCs inducida por el TNF- α (Figura 5.80.B). Además, previamente habíamos visto que el oleato era capaz de inhibir la activación de NF- κ B inducida por el TNF- α (Figura 5.70.B) y que podría ser uno de los mecanismos que no sólo mejoraría la sensibilidad a la insulina (Figura 5.80.C), disminuiría la producción de moléculas implicadas en la disfunción vascular (Figuras 5.72 - 5.74), en la proliferación y apoptosis de las VSMCs, además de mejorar la trombogénesis,

5.2.14. Protector effect of the oleate in the vascular thrombogenesis

The plasminogen-activator inhibitor-1 (PAI-1) is a serine protease, and the main inhibitor of the tissue-type plasminogen activator (tPA) and urokinase-type plasminogen activator (uPA). PAI-1 is therefore an inhibitor of fibrinolysis. High levels of PAI-1 in the blood are a risk factor for thrombogenesis.

In order to study the induction of PAI-1 protein expression by TNF- α in VSMCs, we performed a time course, VSMCs were stimulated with TNF- α (10 ng/ml) from 10 minutes to 24 hours. We observed that TNF- α induces the expression of PAI-1 between 18 and 24 hours in VSMCs (Figure 5.80.A). Next, we decided to explore the effect of oleate on the production of PAI-1 induced by TNF- α in VSMCs. First, we observed that oleate per se did not increase PAI-1 protein levels and, in addition, was able to induce a significant reduction of the PAI-1 protein levels induced by TNF- α (Figure 5.80.B). Finally, we wanted to see if the TNF- α could be increasing the production of PAI-1 in VSMCs through the activation of NF- κ B. For this purpose, cells were pretreated with parthenolide, inhibiting the activation of NF- κ B for 90 minutes prior to stimulation with TNF- α at 10 ng/ml for 24 hours. We observed that by inhibiting NF- κ B pathway the production of PAI-1 induced by TNF- α was partially reduced in VSMCs (Figure 5.80.B). In addition, we previously saw that oleate was able to inhibit the activation of NF- κ B induced by TNF- α (Figure 5.70.B) and that it could be one of the mechanisms that not only could improve insulin sensitivity (Figure 5.70.C), but as well decrease the production of molecules involved in vascular dysfunction (Figures 5.72 - 5.74), in the proliferation and apoptosis of VSMCs (Figures 5.77 - 5.79), on top of improving thrombus formation, promoting fibrinolysis by reducing the production of PAI-1.

favoreciendo la fibrinólisis al reducir la producción de PAI-1.

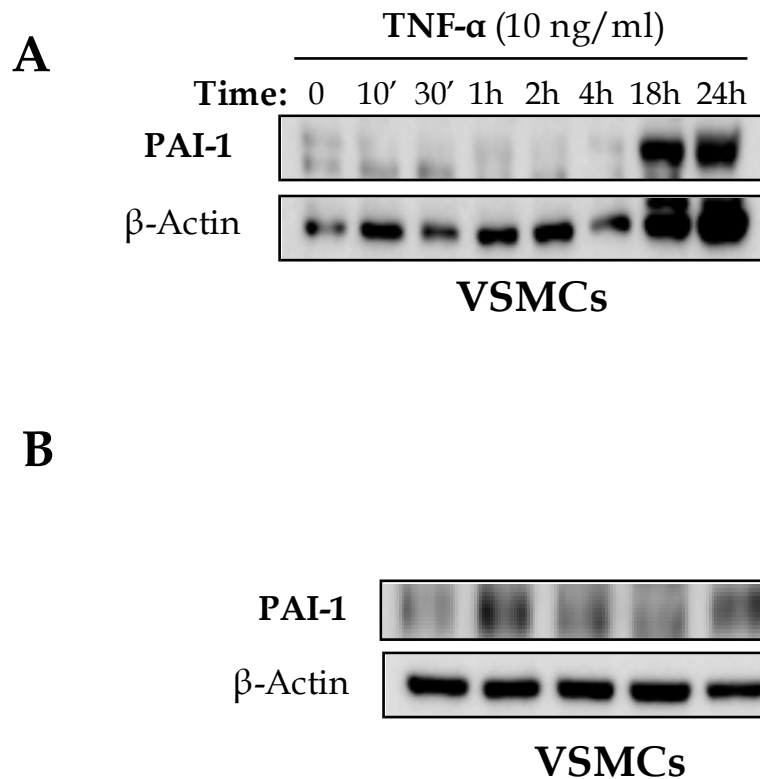


Figura 5.80. Efecto del oleato sobre la producción de PAI-1 en las VSMCs. **A.** Las VSMCs se estimularon con TNF- α desde los 10 minutos a las 24 horas y se analizó mediante Western blot los niveles proteicos de PAI-1. Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina. **(B)** Geles representativos del Western blot frente PAI-1 donde se ha analizado el efecto del oleato en la producción de PAI-1 inducida por el TNF- α . También se estudió si el TNF- α inducía la producción de PAI-1 en VSMCs a través de la activación del NF- κ B y para ello se utilizó un inhibidor de su activación como es el parthenolide a 10-5M durante 90 minutos. Se normalizó frente al nivel endógeno de β -actina..

Figure 5.80. Effect of the oleate on the production of PAI-1 in VSMCs. **A.** VSMCs were stimulated with TNF- α from 10 minutes to 24 hours and the protein levels of PAI-1 were analysed by Western blot. It was normalized against the endogenous level of β -actin. **B.** Western blots representative gels against PAI-1 where the effect of oleate in the production of PAI-1 induced by TNF- α . To know whether TNF- α induced the production of PAI-1 in VSMCs through NF- κ B activation, we used an inhibitor of NF- κ B activation as the parthenolide, at 10-5M for 90 minutes. It was normalized against the endogenous level of β -actin..

6 DISCUSIÓN

6.1. Implicación de la isoforma A del IR y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la proliferación de las células de músculo liso vascular: papel del TNF- α y del IGF-2

La diabetes (DM) y sus complicaciones tanto micro- como macrovasculares como las nefropatías, las retinopatías o la aterosclerosis etc., se han convertido en un problema público global. Muchas de sus complicaciones están asociadas con cambios celulares y subcelulares en los vasos. La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria multifactorial crónica que se caracteriza por la disfunción endotelial y la acumulación de lípidos, células inflamatorias, células de músculo liso y la matriz extracelular en la neointima arterial (Gown et al. 1986). En particular, las células del músculo liso vascular juegan un papel crítico en las numerosas patologías cardiovasculares (Costa & Soares 2013).

La plasticidad de las VSMCs les confiere una capacidad de adaptación esencial para la renovación en estados patológicos. Evidencias clínicas y experimentales sugieren que, en la diabetes, las VSMCs presentan un deterioro del funcionamiento que contribuyen a la mayor incidencia de complicaciones macrovasculares (Guo et al. 2014). Algunos estudios recientes muestran que la resistencia a la insulina podría también contribuir a las patologías neurológicas, al cáncer o la progresión de la aterogénesis en pacientes diabéticos (Janssen & Varewijck 2014; Jin et al. 2014; Hemmati et al. 2014).

El aumento de la proliferación y la migración de las VSMCs contribuyen de manera importante a la respuesta de la lesión en los vasos sanguíneos principales. Las células de músculo liso vascular migran desde la media a la íntima y proliferan formando una neointima con el aumento de la producción de matriz extracelular, dando lugar al desarrollo de una placa aterosclerótica organizada (Bentzon et al. 2014; Ross 1997). Por lo tanto, la formación temprana de la neointima puede contribuir a los procesos inflamatorios y trombóticos, que conduce a la aterosclerosis en la pared del vaso (Schwartz 1999). Los pacientes diabéticos tipo 2, en comparación con sujetos no diabéticos, pueden desarrollar una aterosclerosis acelerada debido principalmente al hecho que sus VSMCs presentan mayores tasas de proliferación, adhesión, y migración, además de una morfología celular alterada (Faries et al. 2001).

Es de gran importancia mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares y los cambios celulares asociados con la lesión vascular, para determinar si la inhibición del crecimiento y la migración de las VSMCs podría servir como una nueva estrategia terapéutica para prevenir las complicaciones vasculares de la diabetes (Hsueh et al. 2001). En este trabajo hemos abordado la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la proliferación de las VSMCs.

Concretamente, se ha estudiado el papel que desempeñan las isoformas IR en este proceso. Para evaluar el papel de las isoformas (A o B) del receptor de insulina (IR) en la proliferación de las VSMCs dentro del proceso aterosclerótico, hemos generado nuevas líneas VSMCs que llevan IR (WT y IRloxP+/+ VSMCs), carente de IR (IR-/- VSMCs) o sólo con la IRA o IRB (IRB y IRA VSMCs).

En primer lugar, demostramos que todas las líneas generadas presentaron niveles similares de distintas proteínas que están implicadas en la señalización de insulina, como IRS-1, p85 α , AKT y Glut-4. Además, demostramos la funcionalidad en cuanto a la señalización de la insulina y la incorporación de la glucosa, a excepción de la línea IR-/- VSMCs carente del receptor de insulina. La fosforilación de AKT y ERK1/2 mediada por la insulina, que son las dos grandes vías de supervivencia en células de mamífero (Siddle 2011), estuvo ausente en las IR-/- VSMCs inmortalizadas. Ambas vías de señalización fueron rescatadas por la reconstitución con la isoforma IRA o la IRB.

Un punto a destacar fue la fosforilación de AKT, p70 y ERK1/2 en respuesta a la insulina en las IRA VSMCs que presentó mayor afinidad y una activación máxima en comparación con las otras líneas celulares, y especialmente en comparación con las IRB VSMCs. En este sentido, anteriormente nuestro grupo describió que la insulina puede inducir la vía de señalización de AKT de manera sostenida en el tiempo en las células β -pancreáticas con la isoforma IRA, en comparación con las células β -pancreáticas que sólo expresaban la IRB. Además, los resultados señalaron que las células β -pancreáticas que sólo expresaban la IRA presentaron un mayor efecto mitogénico en la regulación de la proliferación en relación a las células β -pancreáticas que sólo expresaron la IRB (Bartolomé et al. 2010).

Ampliamente en la literatura se ha reportado que dependiendo del tipo celular, la insulina por la vía de señalización PI3K/AKT induce la translocación del GLUT-4 desde el citosol a la membrana plasmática (Brewer et al. 2014; Sowers 2004). Sin embargo, hasta ahora no se había descrito cual era la isoforma del IR que mediaba la translocación de Glut-4 a la membrana inducida por insulina en las células VSMCs. Nuestros resultados sugieren fuertemente que la isoforma IRA, pero no IRB, media la translocación de GLUT-4. También, nuestros resultados sugieren que la isoforma IRA media la captación de glucosa necesaria para la proliferación celular, en las VSMCs, en respuesta a la insulina.

En segundo lugar, hemos demostrado que la insulina y los estímulos proaterogénicos como el TNF- α , la Ang II, la ET-1 y el TXA2 modifica el perfil de expresión de las isoformas del IR, debido principalmente a un aumento de la expresión de IRA sin cambios en la expresión de IRB. En algunas patologías, como el cáncer, un aumento de la relación IRA/IRB se relaciona con la progresión de la enfermedad (Jiang et al. 2014). Nosotros hemos demostrado que la insulina indujo una mayor proliferación en las células IRA VSMCs en comparación con las IRB VSMCs, principalmente a través de la vía de señalización de ERKs-MAPKs. En este sentido, existen algunos estudios que han demostrado que la vía de señalización ERK1/2 tiene un papel importante en la proliferación de VSMCs inducida por la insulina (Breen & Giacca 2011; Isenović et al. 2010). Además, es importante tener en cuenta que tanto la migración como la proliferación en las VSMCs, también están reguladas por factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), la ET-1, la trombina, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs), la interleucina-1, el TNF- α y el TXA2 (Alfranca et al. 2006; Anfossi et al. 2010; Ross 1993). Anteriormente, otros autores han mostrado que el TNF- α induce la expresión de factores de transcripción implicados en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación, y

la migración en las lesiones vasculares a través de quinasas reguladas por señales extracelulares ERK1/2 (Goetze et al. 2001). En este trabajo hemos demostrado que el TNF- α , la Ang II, la ET-1 y el TXA2, inducen una mayor proliferación en las células IRA VSMCs en comparación con las IRB VSMCs, y que este aumento de la proliferación se debe principalmente a la activación de la vía de señalización de MAPKs (ERK1/2 y p38). Otro estudio también demostró que la Ang II puede activar ERK1/2, JNK y p38 MAPKs, aunque exclusivamente a través del receptor AT-1 en VSMCs (Viedt et al. 2000). Por otra parte, la ET-1 es un potente vasoconstrictor, que induce la proliferación de las VSMCs a través de la activación de los receptores ET-A y ET-B. Algunos autores han demostrado que, en humanos, son los receptores ET-A los que inducen la activación de la ET-1 a través de la vía de ERK1/2 en las VSMCs. Esto se asocia con un incremento de la PKC intracelular, la PKA y de la actividad de la vía PI3K, pero no con la señalización de Ca²⁺ (Chen et al. 2009).

En general, se ha descrito que los receptores proaterogénicos, TNF-Rs (TNF-R1 y TNF-R2), AT-1, ET-A y TP principalmente podría mediar la proliferación celular de las VSMCs inducidos por TNF- α , Ang II, ET-1 y TXA2, respectivamente (Goetze et al. 2001; Ko et al. 1995). Nosotros encontramos que las células que expresan únicamente la isoforma IRA, presentaron niveles basales de proteína más altos para los receptores AT-1, ET-A y TP en comparación con IRB VSMCs; este hecho podría ser una explicación al aumento de la proliferación de estas células en respuesta a la Ang II, ET-1 y el TXA2, respectivamente. En este sentido, se ha descrito que la regulación al alza de la ET-A en VSMCs, como se observa en la aterosclerosis, podría conducir a un aumento en la transducción de señal (Winkles et al. 1993). Así, en los principales componentes celulares de las lesiones ateroscleróticas tempranas, los receptores AT-1 se incrementan y se colocan en placas de ateroma durante el desarrollo y la progresión de la enfermedad coronaria humana (Ohishi et al. 2010). El receptor de TP dentro de la lesión aterosclerótica aórtica se incrementó significativamente en comparación con los controles y se asoció principalmente con las VSMCs (Cyprus et al. 2010).

Además, se estudió la asociación de isoformas IR con TNFRs, AT-1, ET-A o TP; en todos los casos hubo una mayor asociación basal en las IRA VSMCs. Este hecho también podría contribuir a una mayor respuesta proliferativa observada en las IRA VSMCs en comparación con las IRB VSMCs. Por otra parte, aunque los niveles de los receptores TNF-R1 y TNF-R2 fueron muy similares en ambas líneas celulares, el TNF- α favoreció la asociación entre IRA y TNF-R1 de manera dependiente del tiempo en las IRA VSMCs. En este sentido, el TNF-R1 muestra una afinidad mucho más alta al TNF- α en comparación con el TNF-R2 (Grell et al. 1998; MacEwan 2002).

Los datos mostrados anteriormente sugieren que la isoforma IRA y su asociación con el TNF-R1 confieren una ventaja proliferativa a las VSMCs. En esta etapa, nos preguntamos si estos hechos podrían ser de importancia in vivo. Anteriormente se ha descrito in vivo que en la enfermedad aguda renal, después de un tratamiento de manera sistémica con TNF- α , se requiere el TNF-R1 para la acumulación de neutrófilos y monocitos mientras que el TNF-R2 se relaciona con la acumulación de macrófagos (Ernandez et al. 2013). Hasta el momento no se había descrito una posible asociación del IR con los TNF-Rs in vivo. Nosotros observamos que la expresión de la isoforma IRA aumenta significativamente en la arteria aorta de los modelos animales de estudio con alteraciones vasculares: los animales ApoE^{-/-} y BATIRKO. Además, hubo una correlación positiva y significativa entre la expresión de IRA y los marcadores de la disfunción vascular, de la inflamación y del estrés oxidativo. Estos resultados sugieren la implicación de la isoforma IRA, pero no IRB, en el proceso aterosclerótico debido a la ventaja proliferativa que esta

isoforma confiere a las VSMCs. En este sentido, otros estudios también demostraron que IRA desempeña una función importante en los procesos proliferativos, tales como el cáncer (Siddle 2011; Janssen & Varewijck 2014) y la hiperplasia de las células beta como mecanismo compensatorio frente a la resistencia a la insulina (Escribano et al. 2009). Además, en la aorta de ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO se encontró un aumento de TNF-R1 y una mayor asociación entre IRA y TNF-R1. Más importante aún, el tratamiento con anti-TNF- α disminuyó la expresión de ambos receptores, así como la asociación entre el IRA y el TNF-R1 en la aorta de los ratones BATIRKO. Estos resultados sugieren fuertemente que la asociación entre la IRA y TNF-R1 media la proliferación de las VSMCs inducida por el TNF- α . En este sentido, estudios previos han descrito que la señalización de TNF-R1, en particular en las células de la pared arterial, contribuye en las primeras fases del crecimiento de la placa, o en el aumento del desarrollo de la placa en fases posteriores. Esto se favorece mediante el aumento de las quimioquinas en la pared arterial y la expresión de moléculas de adhesión, así como el aumento de la proliferación y la migración de las VSMCs (Zhang et al. 2007).

Por otro lado, la isoforma IRA también podría contribuir al proceso aterosclerótico mediando las acciones proaterogénicas del IGF-2. Está bien establecido que IGF-2 se une con 10 veces mayor afinidad a la isoforma IRA que a IRB (Frasca et al. 1999). Asimismo, IGF-2 ha sido implicado en un bucle positivo autocrino/paracrino, favoreciendo la proliferación de células tumorales que producen IGF-2 (Sciacca et al. 1999). En otras patologías como el cáncer de tiroides se ha identificado una alta producción de IGF-2 con una sobreexpresión del IR. IGF-2 es predominantemente sensible a la isoforma IRA, activando un bucle autocrino que promueve el crecimiento celular contribuyendo así a la progresión de la patología (Vella et al. 2002). Sin embargo, también se ha descrito que los receptores híbridos IRA/IGF-1R están fuertemente activados por el IGF-1 e IGF-2, mientras que los receptores híbridos IRB/IGF-1R están fuertemente activados por el IGF-1 y débilmente activadas por el IGF-2 (Pandini et al. 1999).

En el presente trabajo, hemos demostrado *in vitro* que tanto el IGF-2 como el TNF- α indujeron la sobreexpresión de la isoforma IRA y del IGF-1R, así como un aumento de los receptores híbridos IRA/IGF-1R en las VSMCs. Más importante aún, hemos descrito un aumento significativo en la expresión de IRA y del IGF-1R, así como una mayor formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R *in vivo*, en la aorta de ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO, en comparación con sus correspondientes controles. Teniendo en cuenta el hecho de que el IGF-2 es un promotor fundamental en el crecimiento de la lesión aterosclerótica (Zaina 2002) es factible que la sobreexpresión de la isoforma IRA podría facilitar la formación de receptores híbridos, IRA/IGF-1R, que a su vez faciliten la señalización de IGF-2. Otros autores han descrito previamente un mayor nivel de expresión de IGF-1R en las células de las placas ateroscleróticas de aortas de conejo (Polanco et al. 1996), como hemos observado actualmente en la aorta de la ApoE^{-/-} ratones y BATIRKO. En este sentido, el IGF-1R y la formación de receptores híbridos con la isoforma IRA pueden estar contribuyendo a la proliferación de las VSMCs implicadas en las primeras fases del crecimiento de la placa. En contraste, la expresión del IGF-1 y del IGF-1R se reducen en las placas ateroscleróticas avanzadas y pueden contribuir a la activación de la apoptosis de las VSMCs, que conduciría a un debilitamiento y a la ruptura de la placa que desencadene el evento coronario agudo (Engberding et al. 2009; Okura et al. 2001; Thüsen et al. 2011).

Por último, un aumento significativo de los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la aorta de ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO podría contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina vascular. Por lo tanto, la regulación de la expresión del IGF-1R puede afectar a la sensibilidad de la insulina celular. En este sentido, la regulación a la baja del IGF-1R aumenta la fracción de

receptores de insulina organizados en holoreceptores, un receptor completo cuyas subunidades son capaces de transducir señales intracelulares, que a su vez conducen a la mejora de la señalización de insulina (Engberding et al. 2009). En este sentido, hemos demostrado que los ratones BATIRKO tratados con anti-TNF- α muestran una disminución significativa de la expresión de IRA y del IGF-1R, así como de los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la aorta, además de presentar una mejora de la resistencia a la insulina vascular (Gómez-Hernández, A. et al. 2012).

En conclusión, nuestros datos sugieren fuertemente que la isoforma IRA y la formación de receptores híbridos con TNF-R1 o con IGF-1R, pero no IRB, confiere una ventaja proliferativa a las células de músculo liso vascular in vitro e in vivo principalmente en respuesta a TNF- α o IGF-2, que podría estar involucrado en las fases iniciales del proceso aterosclerótico.

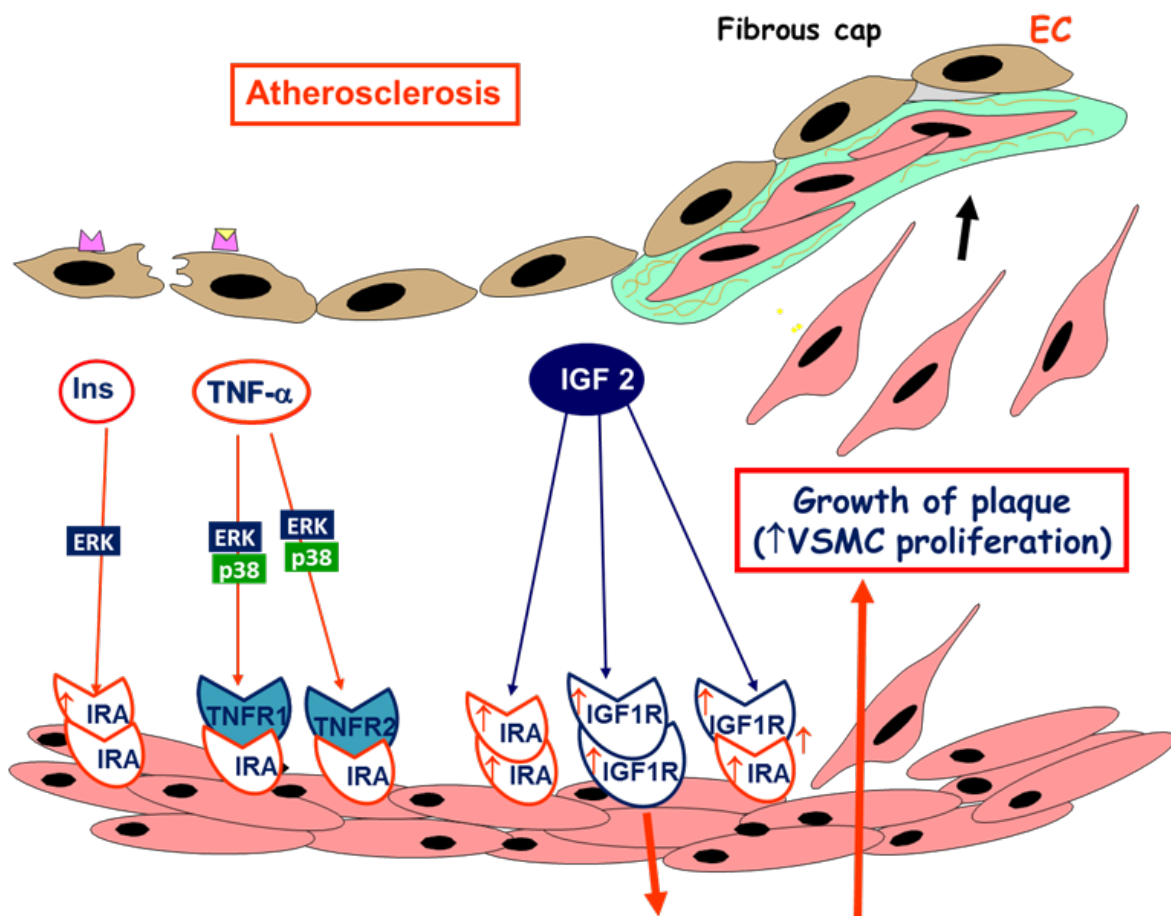


Figura 6.1. Formación de receptores híbridos.

6.2. Efecto antagónico del TNF- α y la insulina en los niveles de expresión de UCP-2 y el daño vascular

El síndrome metabólico es una agrupación de varias anomalías metabólicas que se asocian con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) y diabetes mellitus tipo 2. Debido a su creciente prevalencia, se ha convertido en un importante problema de salud pública. Se ha observado, que las enfermedades coronarias y otras manifestaciones como la aterosclerosis sufrieron un drástico aumento en los últimos años. La aterosclerosis es hoy en día la principal causa de muerte y discapacidad en el mundo (Bentzon et al. 2014). La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica vascular multifactorial, que se caracteriza por la disfunción endotelial y la acumulación de lípidos, células inflamatorias, células de músculo liso y la matriz extracelular en la neointima arterial (Ross 1986). Diversos estudios han implicado a ROS directamente con la progresión de las lesiones ateroscleróticas y en la formación de la placa (Gan et al. 2013). Se ha descrito que todos los componentes celulares de la placa puede responder y ser dañados por ROS, de manera que ROS directamente contribuiría a la progresión de la placa y finalmente, a la ruptura de ésta (Mallat et al. 1999). Además, ROS se ha relacionado con la alta producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6), característico del corazón diabético, la activación de NF- κ B y genes proinflamatorios (Lorenzo et al. 2013). En las VSMCs, el aumento de la expresión de TNF- α , IL-6, IL-1 β , CX3CR1, y MMP-9, además de inducir la activación de STAT3, conduce a la producción de ROS en VSMCs y la sobrerregulación de la resistina en monocitos. A lo largo del tiempo, se han utilizado varios enfoques para detener la producción de ROS y así, alterar la progresión de diferentes enfermedades (Niu et al. 2014; Barry-Lane et al. 2001). Previamente, en la literatura se ha descrito que la sobreexpresión de UCP-2 en los macrófagos disminuye los niveles de ROS intracelulares y reduce su actividad inmune (Ryu et al. 2004), confiriendo así, un posible papel protector a UCP-2 frente a las respuestas patológicas mediadas por ROS como la inflamación y muerte celular producida en patologías como hiperglicemia, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina.

La UCP-2 es una proteína mitocondrial presente en muchos órganos y tipos de células, se conoce para disipar el gradiente protónico de la cadena de transporte de electrones (Rousset et al. 2004), que podría funcionar como una defensa antioxidante de adaptación para proteger contra el desarrollo de la aterosclerosis en respuesta a una dieta alta en grasas y colesterol, y mejorar la disfunción endotelial inducida por la hiperglicemia (Moukdar et al. 2009). El efecto beneficioso a nivel vascular de UCP-2, probablemente, se deba a que favorece un aumento en la disponibilidad de NO por una inhibición de la producción de ROS en el endotelio (Schrauwen et al. 2003; Tian et al., 2012). En la presente tesis, se demuestra que el aumento de la expresión de UCP-2 protege contra la disfunción endotelial inducida por una dieta rica en grasas y que probablemente, esta protección se deba en parte a una inhibición de la producción de ROS. Recientemente, en un estudio en mitocondrias se encontró que el 4 hidroxil-2-nonenal (HNE), producto de la peroxidación como el anión superóxido, potencia la conductancia de la membrana mitocondrial mediada por diferentes ácidos grasos de cadena larga de origen ω -6 (PUFA), cambiando la fluidez de la membrana, activando el extremo amino terminal de la UCP y actuando como un posible activador de las UCPs (Malingriaux et al. 2013). Por otro lado, en células neuronales la grelina aumenta la expresión de UCP-2, disminuyendo el potencial de membrana de la mitocondrial, la reducción de las reacciones de fosforilación oxidativa excesivas y regulando negativamente la

producción de ROS mitocondrial (Fujimura et al. 2014). UCP-2 mantiene el potencial de membrana y regula la producción de ROS mitocondrial durante la fosforilación oxidativa (Andrews 2010). También se ha demostrado que el anión superóxido activa UCP-2, y este mecanismo de regulación funciona como un mecanismo de retroalimentación para el exceso del estrés oxidativo en el sistema (Echtay et al. 2002).

Bajo este escenario, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los ratones BATIRKO con dieta alta en grasa presentan los niveles de expresión de UCP-2 más bajos, al mismo tiempo que manifiestan mayor estrés oxidativo en la aorta. Por otra parte, la disminución de los niveles de UCP-2 en la aorta está inversamente correlacionada con la acumulación de lípidos y el área de lesión en la aorta, tanto en ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad como en ratones BATIRKO obesos normoinsulinémicos. Estos resultados también han sugerido un papel protector de UCP-2 contra el daño vascular y la aterosclerosis, apoyando la teoría de Blanc J. (Blanc et al. 2003) y los hallazgos de Tian Y (Tian et al., 2012). Este efecto del UCP-2 podría estar relacionado con un efecto antiaterogénico en los macrófagos, las ECs y las VSMCs, descrito por otros grupos (Kim et al. 2007). Igualmente, otros autores han demostrado que cuanto mayores sean los niveles de expresión de UCP-2 tanto la proliferación, como la migración y la expresión del PAI-1 en las células humanas de VSMCs está significativamente reducida (J. Park et al. 2005). Además, algunos estudios han propuesto que las UCPs pueden ser parte de un sistema de autorregulación, donde ROS y los productos de peroxidación lipídica activan a las UCPs que lleva a la fuerza motriz de protones y el descenso del potencial de membrana, con una subsiguiente disminución de la producción de ROS (Echtay et al. 2005; Ježek et al. 2010). Sin embargo, otros estudios plantean que UCP-2 es directamente protectora contra las enfermedades vasculares a través de la reducción de la producción de ROS mitocondrial.

Un mejor conocimiento de la regulación de la expresión de UCP-2 en el sistema vascular podría ayudar a mejorar el manejo del proceso aterosclerótico. Sin embargo, el papel de la UCP-2 en la disfunción endotelial de la diabetes todavía no está claro. Por lo tanto, hemos explorado la asociación entre la insulina y UCP-2 tanto in vivo como in vitro. Nuestros resultados sugieren que una hiperinsulinemia moderada en respuesta a la resistencia a la insulina podría inducir la expresión de UCP-2 en las células vasculares, como ECs y VSMCs y en la aorta de animales BATIRKO MH, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que la insulina o la hiperinsulinemia moderada en respuesta a la resistencia a la insulina, inducen la expresión de UCP-2 tanto in vivo como in vitro. Anteriormente, nuestro grupo demostró que la insulina o IGF-1 inducen la expresión de UCP-1 a través de la actividad de IRS-1 o AP-1 de una manera dependiente de la vía PI3K/Akt (Valverde et al. 2003; Teruel et al. 1998). Sin embargo, en el sistema nervioso central y las células humanas del músculo liso vascular el estrés oxidativo inducido por Ang II fue silenciada por la regulación al alza de UCP-2 a través de la activación de p38 MAP quinasa (Fujimura et al. 2014). Otros autores, también han descrito efectos similares de la insulina sobre los niveles de expresión de UCP-2 en las células endoteliales bovinas de la retina microvasculares (Wu et al. 2011) o en el músculo esquelético (Pedersen et al. 2001), correspondiéndose con los niveles de expresión de UCP-2 obtenidos en las células vasculares en esta tesis. Por otra parte, se ha descrito que la terapia intensiva de insulina suprime la expresión del gen iNOS en el hígado y músculo esquelético, posiblemente en parte a través de la reducción de la activación de NF- κ B, y una disminución de los niveles circulantes de NO (Langouche et al. 2005). Por lo tanto, la insulina también podría reducir la activación de NF- κ B y los niveles de iNOS en la aorta y en consecuencia, favorecer la sobreexpresión de UCP-2 y proteger contra el daño vascular.

Entre las diversas señales proinflamatorias y proaterogénicas que ejercen mayor efecto a nivel vascular, el TNF- α es una de las señales más relevantes. Por lo tanto, la relación entre los niveles de expresión de UCP-2 y TNF- α parece ser de importancia en la evaluación del riesgo vascular. En este sentido, hemos demostrado que la insulina y el TNF- α tienen efecto antagónico sobre la expresión de UCP-2 en las ECs y VSMCs. Previamente, se ha publicado que las citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α y/o IL-1 β disminuyen la expresión de UCP-2 en adipocitos (Merial et al. 2000), en las células INS-1 o en islotes pancreáticos de rata (Li, Li-Xin et al. 2003).

Por otra parte, nuestros datos proporcionan un fuerte apoyo *in vivo* de la relación negativa entre el TNF- α y los niveles de expresión de UCP-2. De este modo, los ratones BATIRKO de 52 semanas de edad o los ratones normoinsulinémicos BATIRKO obesos mostraron menores niveles de UCP-2 con respecto a sus respectivos controles, al mismo tiempo que presentaron niveles elevados de expresión de TNF- α en el WAT, el plasma y la aorta. Sin embargo, el TNF- α puede disminuir directamente los niveles de adiponectina, contribuyendo al desarrollo de resistencia vascular a la insulina y la disminución de los niveles de UCP-2 en la aorta (Li, Linget et al. 2009). En este sentido, recientemente se ha descrito que la adiponectina induce la expresión de UCP-2 en el hígado (Zhou et al. 2012). En las dos poblaciones de ratones BATIRKO sometidos a dieta grasa que se han estudiado en la presente tesis se observó una correlación negativa entre los niveles de adiponectina y la expresión de TNF- α , tanto en el WAT como en plasma. Por tanto, los niveles más altos de adiponectina podrían inducir una sobreexpresión de UCP-2 en la aorta, que llevaría a atenuar el daño vascular en estos animales. En este sentido recientemente se ha descrito que los niveles de UCP-1 y adiponectina se correlacionan positivamente en el BAT de humanos (Iacobellis et al. 2013). Los resultados obtenidos con el tratamiento con el anticuerpo anti-TNF- α en el ratón BATIRKO de 52 semanas, apoyan la teoría que el TNF- α regula a la baja los niveles de expresión de UCP-2, puesto que los niveles de UCP-2 aumentaron en la aorta de estos animales cuando se neutralizó el TNF- α circulante.

Otro mecanismo implicado en el efecto inhibitorio del TNF- α sobre los niveles de expresión de UCP-2 es la vía de producción de NO dependiente de la expresión de iNOS en ECs y VSMCs, como se ha descrito previamente en preadipocitos 3T3F442A (Merial et al. 2000). Anteriormente, nuestro grupo demostró que el tratamiento con anti-TNF- α en animales BATIRKO de 52 semanas redujo la actividad de NF- κ B en WAT, BAT y aorta, modulando los niveles de iNOS en aorta (Gómez-Hernández, A. et al. 2012) y aumentado los niveles de UCP-2 en la aorta y en consecuencia una disminución de las alteraciones vasculares que presenta este modelo.

En macrófagos carentes de UCP-2 (UCP-2 $^{-/-}$), el LPS promueve la expresión de la iNOS y la producción de ROS, así como de citoquinas proinflamatorias (Emre et al. 2007; Bai et al. 2005). Nuestros datos sugieren fuertemente una correlación inversa entre la iNOS y UCP-2. Así, los modelos animales de ApoE $^{-/-}$ de 24 semanas, BATIRKO obeso con normoinsulinemia y ratones BATIRKO de 52 semanas de edad presentaron menores niveles de UCP-2, mayor niveles de expresión de iNOS y mayor daño vascular, en comparación con sus controles. Además, el tratamiento con el anticuerpo anti-TNF- α redujo la expresión de iNOS (Gómez-Hernández, A. et al. 2012), normalizando los niveles de UCP-2 y mejorando las alteraciones vasculares descritas en el ratón BATIRKO de 52 semanas de edad.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la insulina y el TNF- α comparten un efecto antagonista sobre los niveles de expresión UCP-2 en las células vasculares y en la aorta de ratones *in vivo*. Así, una moderada hiperinsulinemia en respuesta a la resistencia a la insulina o un descenso de los niveles de TNF- α en la aorta atenúa el daño vascular, siendo un efecto mediado

por el aumento de UCP-2 a través de la reducción de iNOS. Por lo tanto, un aumento de los niveles de la expresión de UCP-2 podría contribuir, al menos en parte, a un mejor control del proceso aterosclerótico principalmente en pacientes obesos, diabéticos o hipertensos que tienen niveles elevados de ROS.

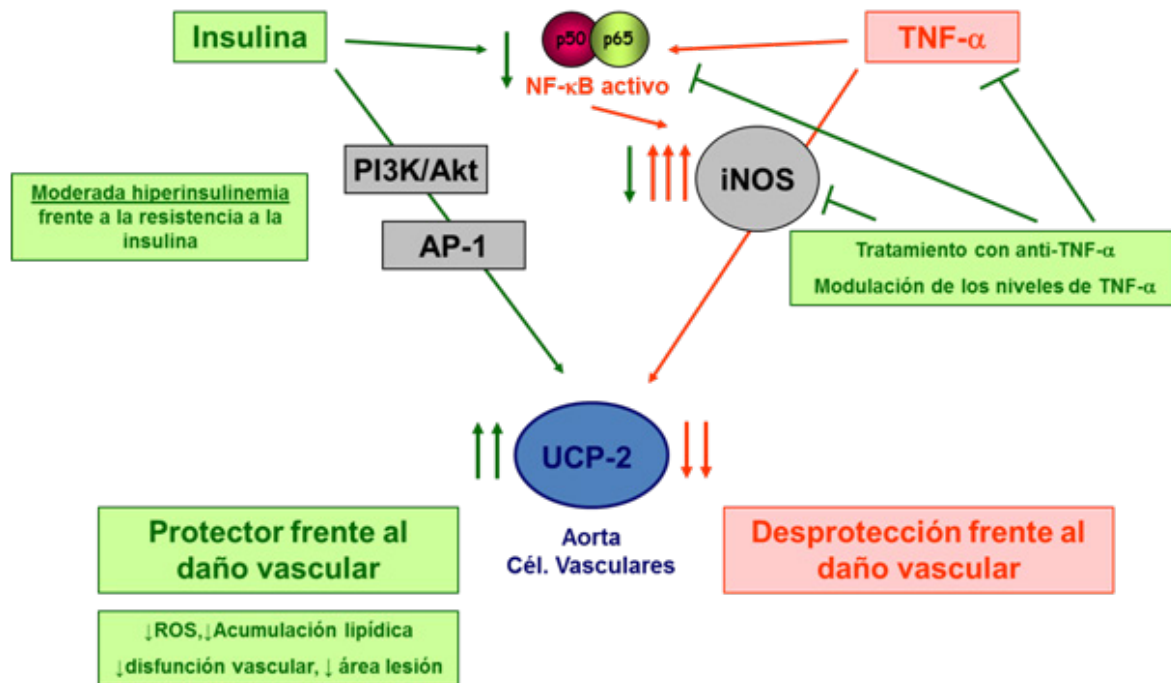


Figura 6.2. Efecto de la UCP-2 sobre el daño vascular

6.3. Papel protector del ácido oleico frente a la inflamación y el daño inducido por el TNF- α y palmitato en las células cardiovasculares

En la presente tesis se muestra la relación entre los efectos protectores de oleato en las células cardiovasculares y en los eventos fisiopatológicos típicos del síndrome metabólico y la aterosclerosis como la inflamación, la proliferación y la apoptosis celular. En los últimos años, la prevalencia de la obesidad y el síndrome metabólico, y su subyacente riesgo de desarrollar CVD, ha aumentado a nivel mundial convirtiéndose en un problema de salud pública (Da Silva et al. 2013), por lo que varias organizaciones han intentado formular criterios sencillos para su diagnóstico (Mayneris-Perxachset al. 2014a). El síndrome metabólico interrelaciona factores de riesgo metabólicos que incluyen: la dislipidemia, la hipertensión, la hiperglucemia en ayunas y la obesidad abdominal (Reaven 2005). Es conocido que los sujetos con síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de desarrollar DM2, a su vez, estas personas suelen presentar sobrepeso u obesidad, con niveles elevados de FFA circulantes. Este aumento contribuye a desarrollar las

complicaciones de la obesidad, como la resistencia a la insulina y el aumento excesivo de grasas en tejidos periféricos (Chavez 2005). Además, el aumento del nivel de FFA circulantes se reconoce como un factor predictivo del infarto agudo de miocardio (Gómez-Hernández et al. 2014) (Gómez-Hernández et al. 2014).

Los ácidos grasos y sus metabolitos pueden formar lípidos complejos, aunque también pueden formar parte de las membranas celulares, encontrándose ubicuamente en las grasas animales, aceites vegetales o ceras (Ibarguren et al. 2014). No obstante, niveles elevados circulantes de FFA no esterificados podrían causar resistencia a la insulina (Salvadó et al. 2013). Igualmente, los metabolitos derivados de los ácidos grasos activos o, unidos a acil-CoA, como los TG, los DAG, y las ceramidas potencialmente pueden tener efectos deletéreos sobre la señalización y la acción de la insulina (Chavez 2005).

Los FFA no esterificados tipo SFA, como el ácido palmítico, se han relacionado con efectos cardiovasculares adversos, éstos son sintetizados endógenamente, aunque también pueden ser encontrados en la dieta (Shen et al. 2013; Harvey et al. 2010b). Sin embargo, los FFA no esterificados tipo PUFAs, como el ácido gamma linoleico, posee propiedades antiinflamatorias (Ibarguren et al. 2014), y los ácidos grasos tipo MUFAs, como el ácido oleico, se ha relacionado con efectos antiproliferativos en el cáncer y una disminución del riesgo de padecer CVD (Moon et al. 2014; Mayneris-Perxachs et al. 2014a; Mayneris-Perxachs et al. 2014b). Igualmente, se ha planteado que las ceramidas estarían implicadas en el efecto inhibitorio de los FFA sobre la señalización del músculo esquelético (Chavez 2005).

Estudios traslacionales como el PREDIMED, realizado recientemente en España, recomiendan la dieta mediterránea y el uso de aceite de oliva, cuyo ácido graso principal es el oleato, debido a la disminución del riesgo CVD y la mejora en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Harvey et al. 2010a; Mayneris-Perxachs et al. 2014a). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales el oleato ejerce su papel protector en las células vasculares no se conocen por completo.

Nuestros resultados muestran que el ácido oleico u oleato tiene un efecto beneficioso en las células cardiovasculares, y diferencial con respecto a otros ácidos grasos saturados como el ácido palmítico. Hasta el momento la evidencia científica apuntaba a que los SFA de cadena larga como el palmitato inducen resistencia a la insulina en tejidos como el adipocito y el músculo esquelético (Gao et al. 2009; Zhou et al. 2013). Nosotros demostramos que en las células cardiovasculares el palmitato, pero no el oleato, induce resistencia a la insulina a concentraciones similares a las concentraciones fisiológicas. Se reconoce que los niveles normales de ácidos grasos libres no esterificados en plasma están entre 0,1 - 0,6 mmol/L o mEq/L (Allard et al. 2003; Roy et al. 2013).

Hemos demostrado que el oleato no genera resistencia a la insulina, ni a concentraciones altas, ni a tiempos largos en ninguna de las líneas vasculares (ECs y VSMCs) ni tampoco en los cardiomiocitos. En el músculo esquelético se plantea un efecto protector del oleato sobre el estrés del retículo y la resistencia a la insulina, mediada por un mecanismo dependiente de AMPK (Salvadó et al. 2013). En las células β -pancreáticas, se ha descrito que a través de la activación de la vía PI3K y PKB, el oleato previene la apoptosis (Wrede et al. 2002). Igualmente, en los miotúbulos el oleato es capaz de prevenir la resistencia a insulina inducida por SFA, como el palmítico, a través de la activación de la vía de PI3K (Gao et al. 2009). En ese sentido, nosotros hemos visto que las células cardiovasculares tratadas con oleato favorecen la señalización de la insulina a través de tanto la vía de PI3K como de MAPKs. Además, nosotros hemos demostrado que el oleato ejerce un efecto protector sobre la viabilidad de las células vasculares, puesto que de manera

independiente de la concentración o el tiempo de tratamiento con el oleato las células se mantienen en número. Sin embargo, el tratamiento con el palmitato presenta un comportamiento diferencial entre las dos líneas vasculares: disminuye la viabilidad de las ECs, pero favoreciendo la proliferación de las VSMCs, pudiendo desempeñar así, un papel importante en la iniciación y la progresión de la aterosclerosis. Anteriormente se ha descrito que en las células endoteliales de aorta humana, los SFA inician la apoptosis además de inducir la respuesta proinflamatoria (Harvey et al. 2010b).

Asimismo, en la literatura se ha planteado que el palmitato puede inducir la apoptosis de las células β -pancreáticas (Liang et al. 2011) y aumentar la proliferación de los hepatocitos, a través de la vía ROS-p38 MAPK/ERK-AKT (Wang et al. 2011). En particular, nosotros demostramos que en las VSMCs, el oleato ejerce un papel protector frente a la proliferación de estas células estimulada por factores proaterogénicos como el TNF- α , la Ang II (Mateo et al. 2007) y los ácidos grasos como el palmitato, contribuyendo a la prevención del crecimiento de la placa aterosclerótica.

El palmitato en particular se ha relacionado con el aumento la producción de citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α e IL-6, y la activación de la vía de NF- κ B en el adipocito (Zhou et al. 2013), además de producir cambios en el fenotipo de las VSMCs (Shen et al. 2013), favoreciendo la formación de la placa aterosclerótica. Anteriormente, nosotros hemos demostrado que el TNF- α induce resistencia a la insulina en las ECs y en las VSMCs (Gómez-Hernández et al. 2014). En la presente tesis, demostramos que en el contexto de las células cardiovasculares, el oleato no sólo no induce resistencia a la insulina sino que es capaz de proteger frente a la resistencia inducida por el palmitato o el TNF- α ; nosotros proponemos que el aumento de UCP-2 por el oleato podría ser uno de los mecanismos por el cual el oleato protege frente a las acciones deletéreas del palmitato sobre las células vasculares (Gómez-Hernández et al. 2014). Aunque recientemente, en las células de músculo esquelético se ha planteado que el oleato podría ejercer un papel protector a través de un mecanismo dependiente de AMPK (Salvadó et al. 2013), nosotros pensamos que en el contexto cardiovascular, el palmitato podría estar activando diferentes vías como la de la MAPKs y el factor de transcripción NF- κ B, al igual que se ha descrito que lo hace el TNF- α . Uno de los mecanismos que podría estar implicado en los efectos deletéreos de los ácidos grasos no saturados, es que ellos pueden actuar como ligandos de los receptores de membrana de la familia de los Toll (TLR) y activarían diferentes vías de señalización que participan en la respuesta inflamatoria (Lee et al. 2003; Lee et al. 2004). Así, se ha descrito que el palmitato a través del TLR2 puede inducir resistencia a la insulina en miotubos, induciendo la activación de NF- κ B, JNK y p38 (Senn 2006).

En las tres líneas celulares, CMs, ECs y VSMCs, tanto el palmitato como el TNF- α activaron la vía MAPK-JNK; JNK a su vez fosforila c-Jun, el miembro más importante de la familia del factor de transcripción AP-1 que está implicada en la supervivencia, la apoptosis, la proliferación y la tumorigénesis (Putchá et al. 2003). Sin embargo, el pretratamiento con oleato disminuyó sustancialmente la activación de las JNK1/2 inducida por TNF- α y palmitato. Estos resultados ratifican que el oleato previene de la resistencia a insulina, puesto que se ha descrito que la activación de la JNK induce la fosforilación del IRS-1, impidiendo así la activación de PI3K/AKT (Fernández-Veledo et al. 2009). Es más, en las VSMCs el oleato mantuvo la fosforilación en Tyr del IRS-1 en presencia de TNF- α o palmitato, favoreciendo la activación de la vía PI3K. Nuestros resultados demuestran que otro mecanismo por el cual el oleato previene la resistencia a la insulina en las VSMCs es la modulación de la activación del factor de transcripción NF- κ B, que puede llegar a ser activado por las citoquinas y LDL oxidadas (Steffan et al. 1995). Nosotros

demostramos que tanto el TNF- α como el palmitato son capaces de disminuir los niveles de I κ B- α , degradándolos y activando al factor de transcripción NF- κ B (Steffan et al. 1995; Perkins 2007). NF- κ B puede activar diversas respuestas fisiológicas, como por ejemplo, la supervivencia celular, la proliferación y la apoptosis. No obstante, el oleato es capaz de reducir la degradación de I κ B- α y por tanto, inhibir la activación de NF- κ B inducida por el TNF- α o el palmitato en las células VSMCs. La reducción de la activación de NF- κ B en las VSMCs se tradujo en prevención de la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α o el palmitato. Comprobamos que el partenolide, el cual impide la fosforilación de la subunidad inhibitoria I κ B- α (Sheehan et al. 2002), impidió la degradación de I κ B- α y por tanto, la activación y translocación de NF- κ B al núcleo, inducida por el TNF- α o el palmitato. Además, en presencia del partenolide se evitó la resistencia a la insulina inducida por el TNF- α y el palmitato, ya que se observa un aumento en la fosforilación de AKT (T308), mientras que en ausencia del partenolide tanto el TNF- α como el palmitato reducían la fosforilación de AKT (Thr 308), impidiendo la señalización de la insulina.

Es conocido que durante procesos como la obesidad o la aterosclerosis, existe un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-6 y el TNF- α , que son capaces de activar el factor NF- κ B en diferentes tejidos. Al mismo tiempo esta citoquinas proinflamatorias activan otros agentes proinflamatorios y quimiotácticos, como las citoquinas, las moléculas de adhesión y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), creando un ciclo de auto-mantenimiento de la inflamación (Karin & Delhase 2000; SenBanerjee et al. 2011). La permanencia del estado inflamatorio en la vasculatura puede inducir disfunción endotelial. En este sentido nuestro trabajo sugiere que el oleato también ejerce un papel protector en la función y activación endotelial además de en la respuesta inflamatoria. Hemos demostrado que el tratamiento con las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 o IL-1 β disminuyen de forma significativa la expresión de UCP-2 en las células endoteliales. Anteriormente, se mostró que el oleato aumentaba la expresión de UCP-2 en las células endoteliales y de músculo liso vascular, produciendo un posible efecto protector frente al daño vascular (Gómez-Hernández et al. 2014). Comprobamos que el oleato juega un papel importante en la prevención de la disfunción vascular inducida por TNF- α , IL-6 o IL-1 β , puesto que logró corregir la disminución de eNOs, que podría desencadenar un desbalance entre las moléculas vasodilatadoras y vasoconstrictoras.

Una vez que el endotelio es disfuncional, se puede activar y aumentar la producción de factores quimiotácticos y moléculas de adhesión (Tabit et al. 2010). En la placa aterosclerótica se produce un aumento de la expresión de moléculas de adhesión proinflamatorias como ICAM-1 y VCAM-1 (Brooks et al. 2002). Nosotros hemos visto que el tratamiento con las citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-6 o IL-1 β , inducen la expresión de ICAM-1 y MCP-1, que favorecen el reclutamiento inflamatorio en el espacio subendotelial. La expresión de estas moléculas inducida por TNF- α e IL-1 β estimularía la producción de PDGF, factor mitogénico que induce la proliferación de VSMCs, por los macrófagos y células residentes favoreciendo así el crecimiento de las placas y la progresión del proceso aterosclerótico (Ross 1999; Motamed et al. 2002). Sin embargo, en las ECs, el oleato redujo de manera significativa la expresión tanto de la molécula de adhesión ICAM-1, como de la molécula quimioatrayente MCP-1. Estos hallazgos se correlacionan con el efecto positivo del oleato encontrado en los adipocitos, las VSMCs y ECs humanas (Harvey et al. 2010a; Lamers et al. 2011; Lamers et al. 2012; Murumalla et al. 2012).

Previamente, hemos demostrado que el oleato tenía un efecto positivo sobre el control de la proliferación inducida por TNF- α en las células de músculo liso vascular. Sin embargo, el TNF- α es capaz de activar dos mecanismos opuestos, como los mecanismos de supervivencia y de muerte celular de forma simultánea (Rath & Aggarwal 1999; Fan 2014). Nosotros encontramos que el TNF- α , pero no el palmítico, inducen significativamente un aumento del porcentaje de células que se encuentran en la fase G0/G1 del ciclo celular, es decir, las VSMCs que están en apoptosis, aunque aumente al mismo tiempo la proliferación de este tipo celular como hemos demostrado previamente. El aumento de la apoptosis de las VSMCs es uno de los mecanismos implicados directamente en la inestabilidad y ruptura de las placas ateroscleróticas, y subyacentes complicaciones como la trombosis (Martín-Ventura 2004; Harari & Liao 2010; Khatib & Vaya 2014). Nosotros planteamos que el pretratamiento con el oleato ejerce un papel protector frente a la apoptosis inducida por el TNF- α , al igual que reduce la proliferación inducida por éste. Es importante resaltar que con el oleato per sé no observábamos ninguna alteración del ciclo celular en las VSMCs, sin embargo, el pre-tratamiento con oleato redujo de forma significativa el porcentaje de células apoptóticas inducido por el TNF- α . Hasta el momento en los cardiomiocitos se ha relacionado un efecto modulador del oleato en la expresión de proteínas proapopticas como Bax, caspasa 3 y la escisión de PARP, que son inducidas por TNF- α (Al-Shudiefat et al. 2013). Y así, confirmamos que el oleato ejerce un papel protector frente a la apoptosis en las VSMCs inducida por estímulos como el TNF- α , valorando la expresión de la caspasa-3 activa. Nosotros, hemos demostrado que el oleato disminuyó la activación de caspasa-3, proteína que desempeña un papel central en la fase de ejecución de la apoptosis celular, inducida no solo por el TNF- α , sino que logró disminuir la expresión inducida por la taspigargina, un inhibidor no competitivo de las enzimas SERCA, que induce estrés en el retículo endoplásmico (Lytton et al. 1991). Aunque anteriormente, se había mostrado que el palmitato es un ácido graso que aumenta la viabilidad y proliferación de las VSMCs, no presentó ningún efecto protector sobre la expresión de la caspasa 3 activa inducida por taspigargina. Sin embargo, el oleato en presencia de palmitato redujo la apoptosis inducida por taspigargina.

Las elevadas concentraciones del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) se asocian con un aumento de las enfermedades cardiovasculares y eventos trombóticos (Iwaki et al. 2012). Además, PAI-1 puede producir un aumento de la grasa visceral, que pueden llevar al aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias por los adipocitos (Kato et al. 2006). Nosotros encontramos que el pretratamiento con oleato no aumenta los niveles de expresión de PAI-1, es más, disminuye la expresión de PAI-1 inducida por el TNF- α en las VSMCs, y demostramos que el aumento de PAI-1 inducido por TNF- α es a través de la activación de NF- κ B, puesto que al utilizar un inhibidor de esta vía como el partenolide se disminuye la producción de PAI-1 inducida por el TNF- α en las VSMCs.

Finalmente planteamos que el oleato media sus efectos protectores a través de la inhibición de la activación de la vía de NF- κ B, mejorando así la sensibilidad a la insulina, disminuyendo la producción de moléculas implicadas en la disfunción vascular, y ejerciendo un control sobre la viabilidad de las células vasculares, y la proliferación y apoptosis de las VSMCs, además de mejorar la trombogénesis, favoreciendo la fibrinólisis al reducir la producción de PAI-1 e impedir la disminución de la UCP-2, impidiendo así la progresión del daño vascular.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que el ácido oleico tiene un efecto beneficioso a nivel cardiovascular y diferencial con respecto a otros ácidos grasos saturados como el ácido palmítico. Este efecto protector del ácido oleico es debido a la reducción de la resistencia a la insulina cardiovascular, de la disfunción vascular, del crecimiento y de la inestabilidad de la placa

aterosclerótica. Además, estos procesos podrían estar mediados por el aumento de UCP-2 y la reducción de la activación de las JNK-1/-2 y de la vía del factor de transcripción NF- κ B.

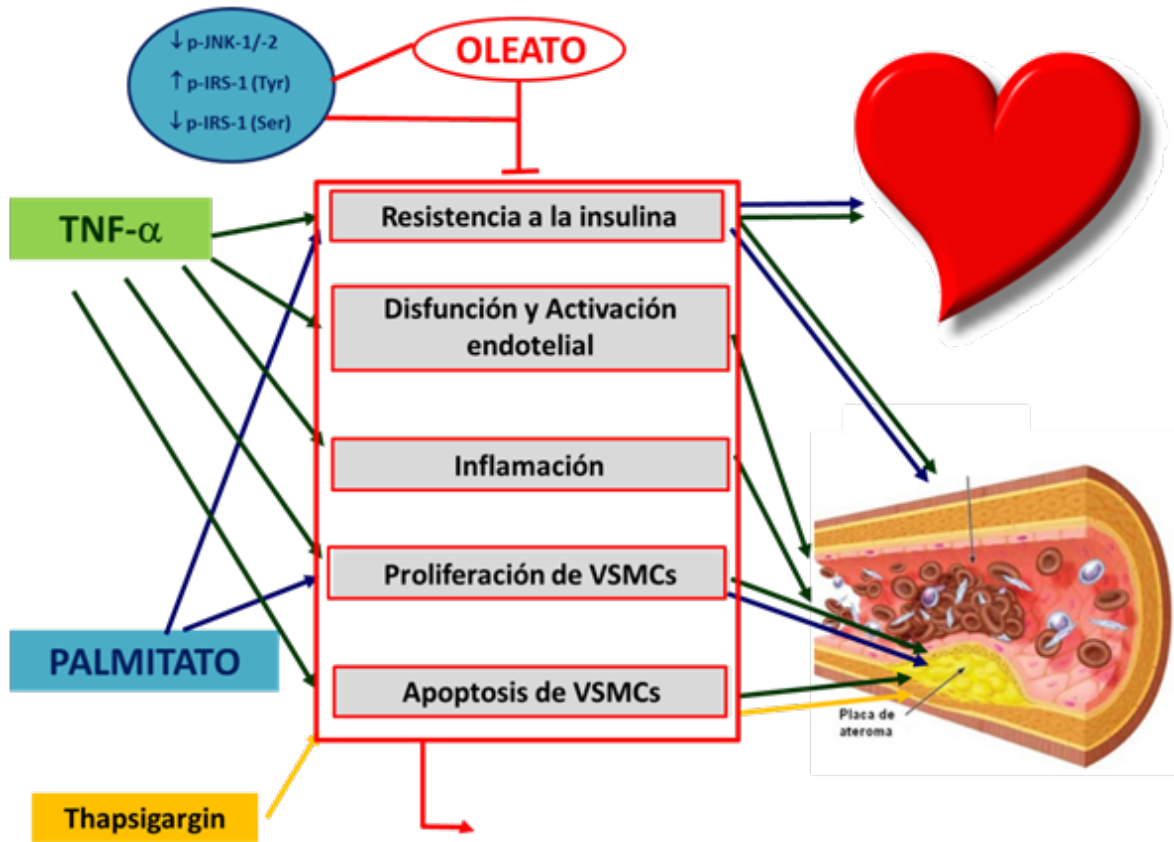


Figura 6.3. Efecto Protector del oleato

7 CONCLUSIONES CONCLUSION

7.1. Conclusiones en español

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

1) La isoforma A del receptor de la insulina y su asociación con el TNF-R1 o con el IGF-1R podría conferir una ventaja proliferativa a las células de músculo liso vascular, principalmente en respuesta a TNF- α o IGF-2, que podría ser de gran importancia en el crecimiento de la placa aterosclerótica ocurrido durante las fases iniciales del proceso aterogénico.

2) La moderada hiperinsulinemia frente a la resistencia a la insulina o la reducción de los niveles de TNF- α en la aorta podrían atenuar el daño vascular. Este efecto protector está mediado por un aumento de los niveles de UCP-2 en la aorta, a través de la inhibición de iNOS.

3) Tanto la insulina y el TNF- α comparten un efecto antagonista sobre los niveles de expresión UCP-2 en las células vasculares in vitro y también in vivo, en la aorta de ratones. Por lo tanto, un aumento de los niveles de la expresión UCP-2 podría contribuir a un mejor control del proceso aterosclerótico principalmente en pacientes obesos, diabéticos o hipertensos con niveles elevados de expresión de ROS.

4) El tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α en un modelo experimental con alteraciones metabólicas y en la función vascular, normalizó los parámetros metabólicos y mejoró la función y resistencia vascular a la insulina por una reducción en el crecimiento de la placa, al disminuir la expresión de IRA y su asociación con IGF-1R y TNF-R1 en la aorta, además de inducir la sobreexpresión de UCP-2 en la aorta como mecanismo protector.

5) El ácido oleico tiene un efecto beneficioso a nivel cardiovascular y diferencial con respecto a otros ácidos grasos saturados como el ácido palmítico. Este efecto protector del ácido oleico es debido a la reducción de la resistencia a la insulina cardiovascular, de la disfunción vascular, del crecimiento y de la inestabilidad de la placa aterosclerótica. Además, estos procesos podrían estar mediados por el aumento de UCP-2 y la reducción de la activación de las JNK-1/-2 y de la vía del factor de transcripción NF- κ B.

CONCLUSIÓN FINAL

Esta tesis ha permitido por primera vez implicar a la isoforma A del receptor de la insulina en el crecimiento de la placa aterosclerótica. Por otro lado, ha permitido establecer mecanismos de protección frente a ese daño que podrían estar mediados por UCP-2, JNK-1/-2 o NF- κ B. Apoyando además, los efectos beneficiosos a nivel cardiovascular del ácido oleico, como componente lipídico mayoritario del aceite de oliva virgen, principal en la dieta mediterránea.

7.2. Conclusion in English

Based on the objectives and the results obtained in this study, we can draw the following conclusions:

1) Insulin receptor A isoform and its association with the TNF-R1 or the IGF-1R might confer a proliferative advantage to vascular smooth muscle cells, mainly in response to TNF- α or IGF-2, which could be of great importance in the growth of atherosclerotic plaque occurred during the initial stages of the atherogenic process.

2) Moderate hyperinsulinemia against insulin resistance or reduced levels of TNF- α in the aorta might attenuate the vascular injury. This protective effect is mediated by increased levels of UCP-2 in the aorta, through the inhibition of iNOS.

3) Both insulin and TNF- α share an antagonistic effect on the level of UCP-2 expression as in vitro in vascular cells as in vivo in the aorta of mice. Therefore, an increase of the expression levels of UCP-2 might contribute to improved control of atherosclerotic process primarily in obese, diabetic or hypertensive patients with high expression levels of ROS.

4) Treatment with a monoclonal anti-TNF- α antibody in an experimental model with metabolic and vascular function abnormalities, normalized metabolic parameters and improved vascular function and vascular insulin resistance. These facts are due to reduction of the plaque growth, and decreased of IRA expression and their association with IGF-1R and TNF-R1 in the aorta. Also, it induced overexpression of UCP-2 in the aorta as a protective mechanism.

5) Oleic acid has a beneficial effect at cardiovascular level and differential over other saturated fatty acids such as palmitic acid. This protective effect of oleic acid is due to a reduction of the cardiovascular insulin resistance, vascular dysfunction, the growth and the instability of atherosclerotic plaque. Furthermore, these processes may be mediated by an increase in UCP-2 and a reduction of the JNK-1/2 activation and the NF- κ B transcription factor pathway.

FINAL CONCLUSION

This thesis has allowed, for the first time, to involve the insulin receptor A isoform in the growth of the atherosclerotic plaque. Moreover, it has established the protector mechanisms to against the vascular damage could be mediated by UCP-2, JNK-1/2 or NF- κ B. It also supports the beneficial effects at cardiovascular level of the oleic acid, the major lipid component of virgin olive oil, an essential element in the Mediterranean diet.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abumrad, N.A. et al., 1981. Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *The Journal of biological chemistry*, 256(17), pp.9183-91.
- Al-Shudiefat, al, A.R. et al., 2013. Oleic acid mitigates TNF- α -induced oxidative stress in rat cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 372(1-2), pp.75-82.
- Alfranca, A. et al., 2006. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: Role in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research*, 70(3), pp.446-456.
- Allard, P. et al., 2003. Distribution of fasting plasma insulin, free fatty acids, and glucose concentrations and of homeostasis model assessment of insulin resistance in a representative sample of Quebec children and adolescents. *Clinical chemistry*, 49(4), pp.644-9.
- Almind, K. & Kahn, C.R., 2004. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes*, 53(12), pp.3274-85.
- Almind, K. et al., 2007. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), pp.2366-71.
- Alonso-Chamorro, M. et al., 2011. New emerging role of protein-tyrosine phosphatase 1B in the regulation of glycogen metabolism in basal and TNF- α -induced insulin-resistant conditions in an immortalised muscle cell line isolated from mice. *Diabetologia*, 54(5), pp.1157-1168.
- Alves-Bezerra, M. et al., 2014. Identification of uncoupling protein 4 from the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* and its possible role on protection against oxidative stress. *Insect biochemistry and molecular biology*, 50, pp.24-33.
- Andrews, Z.B., 2010. Uncoupling protein-2 and the potential link between metabolism and longevity. *Current aging science*, 3(2), pp.102-12.
- Anfossi, G. et al., 2010. Adipocytokines in atherothrombosis: focus on platelets and vascular smooth muscle cells. *Mediators of inflammation*, 2010, p.174341.
- Aragonés, G. et al., 2012. Fatty acid-binding protein 4 impairs the insulin-dependent nitric oxide pathway in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Diabetology*, 11(1), p.72.
- Arend, W.P. & Dayer, J.M., 1995. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 38(2), pp.151-60.

- Badimon, L., Vera, R.H. & Vilahur, G., 2013. Atherothrombotic risk in obesity. *Hämostaseologie*, 33(4), pp.259-68.
- Bai, Y. et al., 2005. Persistent nuclear factor-kappa B activation in Ucp2^{-/-} mice leads to enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine production. *The Journal of biological chemistry*, 280(19), pp.19062-9.
- Baker, R.G., Hayden, M.S. & Ghosh, S., 2011. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metabolism*, 13(1), pp.11-22.
- Banting, F.G. et al., 1922. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Canadian Medical Association journal*, 12(3), pp.141-6.
- Barry-Lane, P.A. et al., 2001. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE^(-/-) mice. *The Journal of clinical investigation*, 108(10), pp.1513-22.
- Bartelt, A. et al., 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine*, 17(2), pp.200-5.
- Bartolomé, A., Guillén, C. & Benito, Manuel, 2010. Role of the TSC1-TSC2 Complex in the Integration of Insulin and Glucose Signaling Involved in Pancreatic β -Cell Proliferation. *Endocrinology*, 151(7), pp.3084-3094.
- Bauer, S., Müller, T. & Hamm, S., 2009. Pattern recognition by Toll-like receptors. *Advances in experimental medicine and biology*, 653, pp.15-34.
- Baum, S.J. et al., 2012. Fatty acids in cardiovascular health and disease: A comprehensive update. *Journal of Clinical Lipidology*, 6(3), pp.216-234.
- Bayes-Genis, A., Conover, C.A. & Schwartz, R.S., 2000. The Insulin-Like Growth Factor Axis : A Review of Atherosclerosis and Restenosis. *Circulation Research*, 86(2), pp.125-130.
- Begum, N., 2003. Insulin signaling in the vasculature. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 8, pp.s796-804.
- Beinke, S. & Ley, S.C., 2004. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *The Biochemical journal*, 382(Pt 2), pp.393-409.
- Belfiore, A. et al., 2009. Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. *Endocrine Reviews*, 30(6), pp.586-623.
- Belke, D.D. et al., 2002. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *The Journal of clinical investigation*, 109(5), pp.629-39.
- Benito, M, Porras, A. & Santos, E., 1993. Establishment of permanent brown adipocyte cell lines achieved by transfection with SV40 large T antigen and ras genes. *Experimental cell research*, 209(2), pp.248-54.
- Bentzon, J. F. et al., 2014. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circulation Research*, 114(12), pp.1852-1866.

- Berber, E., 2012. The Molecular Genetics of von Willebrand Disease. *Turkish Journal of Hematology*, 29(4), pp.313-324.
- Bezair, V., Seifert, E.L. & Harper, M., 2007. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *The FASEB Journal*, 21(2), pp.312-324.
- Blanc, J et al., 2003. Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation*, 107(3), pp.388-90.
- Boden, G., 2001. Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 7(1), pp.44-51.
- Boord, J.B., Fazio, S. & Linton, M.F., 2002. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, 13(2), pp.141-7.
- Bourlier, V. et al., 2008. Remodeling Phenotype of Human Subcutaneous Adipose Tissue Macrophages. *Circulation*, 117(6), pp.806-815.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248-54.
- Brasier, A.R., 3rd, A.R. & Eledrisi, M.S., 2002. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(8), pp.1257-66.
- Braunersreuther, V. & Mach, F., 2006. Leukocyte recruitment in atherosclerosis: potential targets for therapeutic approaches? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(18), pp.2079-88.
- Breen, D.M. & Giacca, A., 2011. Effects of insulin on the vasculature. *Current vascular pharmacology*, 9(3), pp.321-32.
- Brewer, P.D. et al., 2014. Insulin-regulated Glut4 Translocation: MEMBRANE PROTEIN TRAFFICKING WITH SIX DISTINCTIVE STEPS. *The Journal of biological chemistry*, 289(25), pp.17280-17298.
- Brooks, A.R., Lelkes, P.I. & Rubanyi, G.M., 2002. Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiological genomics*, 9(1), pp.27-41.
- Bryan, M.T. et al., 2014. Mechanoresponsive Networks Controlling Vascular Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.
- Brüning, J.C., Winnay, J., Bonner-Weir, S., et al., 1997a. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*, 88(4), pp.561-72.
- Brüning, J.C., Winnay, J., Cheatham, B., et al., 1997b. Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), pp.1513-21.

- Busse, R. & Mülsch, A., 1990. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Letters*, 265(1-2), pp.133-6.
- Carlos, T.M. & Harlan, J.M., 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84(7), pp.2068-101.
- Carter, S. et al., 2013. Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clinical interventions in aging*, 8, pp.829-44.
- Cascio, G., Schiera, G. & Di Liegro, I., 2012. Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases. *Current diabetes reviews*, 8(1), pp.2-17.
- Chang, L. et al., 2013. Paradoxical roles of perivascular adipose tissue in atherosclerosis and hypertension. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 77(1), pp.11-8.
- Chartoumpekis, D.V. et al., 2011. Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(7-8), pp.736-40.
- Chavez, J.A., 2005. Acid Ceramidase Overexpression Prevents the Inhibitory Effects of Saturated Fatty Acids on Insulin Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), pp.20148-20153.
- Chawla, A., Nguyen, K.D. & Goh, Y.P.S., 2011. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), pp.738-749.
- Chen, L.Y., Mehta, P. & Mehta, J.L., 1996. Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation*, 93(9), pp.1740-6.
- Chen, Q., Edvinsson, L. & Xu, C., 2009. Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC cell biology*, 10, p.52.
- Chen, Y., 2006. Augmentation of Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells by Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(8), pp.1777-1783.
- Chen, Yung-Chih et al., 2013. A novel mouse model of atherosclerotic plaque instability for drug testing and mechanistic/therapeutic discoveries using gene and microRNA expression profiling. *Circulation Research*, 113(3), pp.252-65.
- Choi, S. et al., 2008. Protective Role of Autophagy in Palmitate-Induced INS-1 -Cell Death. *Endocrinology*, 150(1), pp.126-134.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), pp.156-9.
- Claudio, E. et al., 2002. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nature immunology*, 3(10), pp.958-65.

- Cohn, J.N. & Tognoni, G., 2001. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *The New England journal of medicine*, 345(23), pp.1667-75.
- Costa, P.Z. & Soares, R., 2013. Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life Sciences*, 92(22), pp.1037-1045.
- Crisan, M. et al., 2012. Perivascular cells for regenerative medicine. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(12), pp.2851-60.
- Csiszar, A. et al., 2007. Vascular superoxide and hydrogen peroxide production and oxidative stress resistance in two closely related rodent species with disparate longevity. *Aging cell*, 6(6), pp.783-97.
- Cushing, S.D. et al., 1990. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(13), pp.5134-8.
- Cybulsky, M.I. & Gimbrone, M.A., Jr, 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4995), pp.788-91.
- Cypess, A.M. et al., 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine*, 360(15), pp.1509-17.
- Cyrus, T., Ding, T. & Praticò, D., 2010. Expression of thromboxane synthase, prostacyclin synthase and thromboxane receptor in atherosclerotic lesions: correlation with plaque composition. *Atherosclerosis*, 208(2), pp.376-81.
- Dandona, P. et al., 1998. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 83(8), pp.2907-10.
- Da Silva, T.F. et al., 2013. High prevalence of metabolic syndrome in Takayasu arteritis: increased cardiovascular risk and lower adiponectin serum levels. *The Journal of rheumatology*, 40(11), pp.1897-904.
- Daugherty, A. et al., 2010. Genetic Variants of the Renin Angiotensin System: Effects on Atherosclerosis in Experimental Models and Humans. *Current Atherosclerosis Reports*, 12(3), pp.167-173.
- DeCaprio, J.A. et al., 1988. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54(2), pp.275-83.
- Delafontaine, P., Song, Y.-. & Li, Y., 2004. Expression, Regulation, and Function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 Binding Proteins in Blood Vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(3), pp.435-444.
- Dellamea, B.S. et al., 2014. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 6(1), p.17.

- Denley, A. et al., 2003. The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 35(11-12), pp.778-85.
- Denley, A. et al., 2004. Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(10), pp.2502-12.
- de Brondani, L.A. et al., 2014. Association of the UCP polymorphisms with susceptibility to obesity: case-control study and meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 41(8), pp.5053-67.
- de Brondani, L.A. et al., 2012. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 56(4), pp.215-25.
- de Meyts, P. & Whittaker, J., 2002. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(10), pp.769-83.
- Diano, S. & Horvath, T.L., 2012. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends in Molecular Medicine*, 18(1), pp.52-8.
- Di Massimo, C. et al., 2006. Impaired plasma nitric oxide availability and extracellular superoxide dismutase activity in healthy humans with advancing age. *Life Sciences*, 78(11), pp.1163-7.
- Donadelli, M. et al., 2014. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(7), pp.1171-1190.
- Dong, Z.M. et al., 1998. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 102(1), pp.145-52.
- Dudzinski & Michel, 2007. Life history of eNOS: Partners and pathways. *Cardiovascular Research*, 75(2), pp.247-260.
- Duncan, E.R. et al., 2008. Effect of Endothelium-Specific Insulin Resistance on Endothelial Function In Vivo. *Diabetes*, 57(12), pp.3307-3314.
- Ebara, T. et al., 2000. Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. *The Journal of clinical investigation*, 105(12), pp.1807-18.
- Echtay, K.S. 2007. Mitochondrial uncoupling proteins—What is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine*, 43(10), pp.1351-1371.
- Echtay, K.S. et al., 2005. Hydroxynonenal and uncoupling proteins: a model for protection against oxidative damage. *BioFactors (Oxford, England)*, 24(1-4), pp.119-30.
- Echtay, K.S. et al., 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, 415(6867), pp.96-9.
- Eckel, R.H. et al., 2011. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *Diabetes Care*, 34(6), pp.1424-30.

- Emanuelli, B. et al., 2014. Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 124(2), pp.515-527.
- Emori, T. et al., 1993. Cellular mechanism of natriuretic peptides-induced inhibition of endothelin-1 biosynthesis in rat endothelial cells. *Endocrinology*, 133(6), pp.2474-80.
- Emre, Y. et al., 2007. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *The Biochemical journal*, 402(2), pp.271-8.
- Engberding, N. et al., 2009. Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Expression Masks the Antiinflammatory and Glucose Uptake Capacity of Insulin in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(3), pp.408-415.
- Ernandez, T. et al., 2013. Endothelial TNF Receptor 2 Induces IRF1 Transcription Factor-Dependent Interferon- β Autocrine Signaling to Promote Monocyte Recruitment. *Immunity*, 38(5), pp.1025-1037.
- Escribano, O. et al., 2009. β -Cell Hyperplasia Induced by Hepatic Insulin Resistance: Role of a Liver-Pancreas Endocrine Axis Through Insulin Receptor A Isoform. *Diabetes*, 58(4), pp.820-828.
- Escribano, O. et al., 2007. IRS-3 mediates insulin-induced glucose uptake in differentiated IRS-2(-/-) brown adipocytes. *Molecular and cellular endocrinology*, 268(1-2), pp.1-9.
- Estruch, R. et al., 2014. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet., pp.1-12.
- Estruch, R. et al., 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *The New England journal of medicine*, 368(14), pp.1279-90.
- Fan, J., 2014. Naofen promotes TNF- α -mediated apoptosis of hepatocytes by activating caspase-3 in lipopolysaccharide-treated rats. *World Journal of Gastroenterology*, 20(17), p.4963.
- Faries, P.L. et al., 2001. Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. *Journal of vascular surgery*, 33(3), pp.601-7.
- Fernández-Veledo, S. et al., 2009. c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor- α induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(9), pp.3583-93.
- Finocchietto, P.V. et al., 2009. Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 234(9), pp.1020-8.
- Fitzgibbons, T.P. et al., 2011. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301(4), pp.H1425-37.

- Flick, D.A. & Gifford, G.E., 1984. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *Journal of immunological methods*, 68(1-2), pp.167-75.
- Fortenberry, Y.M., 2013. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors: a patent review (2006 – present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(7), pp.801-815.
- Frasca, F. et al., 1999. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 19(5), pp.3278-88.
- Frühbeck, G. et al., 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 280(6), pp.E827-47.
- Fujimura, K. et al., 2014. Ghrelin Protects against Renal Damages Induced by Angiotensin-II via an Antioxidative Stress Mechanism in Mice M. C. Vinci, ed. *PloS one*, 9(4), p.e94373.
- Fujita, T. et al., 1993. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes & development*, 7(7B), pp.1354-63.
- Fukazawa, H. et al., 2002. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) inhibitors restore anoikis sensitivity in human breast cancer cell lines with a constitutively activated extracellular-regulated kinase (ERK) pathway. *Molecular cancer therapeutics*, 1(5), pp.303-9.
- Fuster, J.J. & Walsh, K., 2014. The Good, the Bad, and the Ugly of interleukin-6 signaling. *The EMBO journal*, 33(13), pp.1425-7.
- Fuster, V. et al., 1992. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *The New England journal of medicine*, 326(5), pp.310-8.
- Félix-Redondo, F.J. et al., 2013. Prevalence of obesity and associated cardiovascular risk: the DARIOS study. *BMC Public Health*, 13(1), p.542.
- Föger, B. et al., 1999. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 274(52), pp.36912-20.
- Förstermann, U. & Kleinert, H., 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 352(4), pp.351-64.
- Gan, A.M. et al., 2013. Monocytes and smooth muscle cells cross-talk activates STAT3 and induces resistin and reactive oxygen species production [corrected]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(10), pp.2273-83.

- Gao, D., Griffiths, H.R. & Bailey, C.J., 2009. Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6 myotubes. *British Journal of Nutrition*, 102(11), p.1557.
- Gasparini, C. et al., 2014. NF- κ B pathways in hematological malignancies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(11), pp.2083-102.
- Gastaldelli, A. et al., 2002. Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(11), pp.5098-103.
- Gaur, U. & Aggarwal, Bharat B, 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical pharmacology*, 66(8), pp.1403-8.
- George, S. et al., 2004. A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5675), pp.1325-8.
- Ghosh, S., May, M.J. & Kopp, E.B., 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, 16, pp.225-60.
- Gibbons, C. et al., 2014. METABOLIC PHENOTYPING GUIDELINES: Studying eating behaviour in humans. *Journal of Endocrinology*, 222(2), pp.G1-G12.
- Gilsanz, V., Hu, H.H. & Kajimura, S., 2012. Relevance of brown adipose tissue in infancy and adolescence. *Pediatric research*, 73(1), pp.3-9.
- Gjoerup, O. et al., 2000. pRB-dependent, J domain-independent function of simian virus 40 large T antigen in override of p53 growth suppression. *Journal of virology*, 74(2), pp.864-74.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J., 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology*, 72(11), pp.1493-505.
- Gnacińska, M. et al., 2010. Adipose tissue activity in relation to overweight or obesity. *Endokrynologia Polska*, 61(2), pp.160-8.
- Goetze, S. et al., 2001. TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis*, 159(1), pp.93-101.
- Golfman, L.S. et al., 1993. Role of endothelin in heart function in health and disease. *The Canadian journal of cardiology*, 9(7), pp.635-53.
- Golledge, J. & Siew, D., 2008. Identifying the carotid 'high risk' plaque: is it still a riddle wrapped up in an enigma? *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, 35(1), pp.2-8.
- Gómez-Hernández, A. et al., 2014. Antagonistic effect of TNF- α and insulin on UCP-2 expression and vascular damage. *Cardiovascular Diabetology*, 13(1).

- Gómez-Hernández, A. et al. 2013. Implication of Insulin Receptor A Isoform and IRA/IGF-IR Hybrid Receptors in the Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation: Role of TNF- α and IGF-II. *Endocrinology*, 154(7), pp.2352-2364.
- Gómez-Hernández, A. et al., 2012. Brown Fat Lipoatrophy and Increased Visceral Adiposity through a Concerted Adipocytokines Overexpression Induces Vascular Insulin Resistance and Dysfunction. *Endocrinology*, 153(3), pp.1242-1255.
- Gown, A.M., Tsukada, T. & Ross, R., 1986. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *The American Journal of Pathology*, 125(1), pp.191-207.
- Greeve, J. et al., 1993. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *Journal of lipid research*, 34(8), pp.1367-83.
- Grell, M. et al., 1998. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), pp.570-5.
- Griendling, K.K. & FitzGerald, G.A., 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*, 108(17), pp.2034-40.
- Guerra, C. et al., 2001. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 108(8), pp.1205-13.
- Guillén et al., 2013. Concerted expression of the thermogenic and bioenergetic mitochondrial protein machinery in brown adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(10), pp.2306-13.
- Guillén et al., 2006. Differential mitogenic signaling in insulin receptor-deficient fetal pancreatic beta-cells. *Endocrinology*, 147(4), pp.1959-68.
- Guo, R. et al., 2014. Fasudil improves short-term echocardiographic parameters of diastolic function in patients with type 2 diabetes with preserved left ventricular ejection fraction: a pilot study. *Heart and Vessels*.
- Gupta, K.J. & Kaiser, W.M., 2010. Production and Scavenging of Nitric Oxide by Barley Root Mitochondria. *Plant and Cell Physiology*, 51(4), pp.576-584.
- Gupta, K.J., Kaiser, W.M. & Igamberdiev, A.U., 2010. New insights into the mitochondrial nitric oxide production pathways. *Plant signaling & behavior*, 51(4), pp.576-584.
- Gupta, S. et al., 2013. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) is a critical determinant of bladder cancer invasion. *PLoS one*, 8(11), p.e81081.

- Gustafson, B. et al., 2009. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 297(5), pp.E999-E1003.
- Heinrich, P. et al., 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374(1), p.1.
- Haffner, S. & Taegtmeyer, H., 2003. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation*, 108(13), pp.1541-5.
- Haffner, S.M. et al., 1998. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in non-diabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England journal of medicine*, 339(4), pp.229-34.
- Harari, O.A. & Liao, J.K., 2010. NF- κ B and innate immunity in ischemic stroke. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1207(1), pp.32-40.
- Harrison, D. et al., 2003. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American journal of cardiology*, 91(3A), pp.7A-11A.
- Harvey, K. A. et al., 2010a. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *The Journal of Lipid Research*, 51(12), pp.3470-3480.
- Harvey, K. A. et al., 2010b. Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 29(4), pp.492-500.
- Heijnen, H.F. et al., 2014. Ribosomal Protein Mutations Induce Autophagy through S6 Kinase Inhibition of the Insulin Pathway G. S. Barsh, ed. *PLoS Genetics*, 10(5), p.e1004371.
- Hemmati, F. et al., 2014. Crosstalk Between Insulin and Toll-like Receptor Signaling Pathways in the Central Nervous system. *Molecular neurobiology*.
- Henning, C.H.C.A. et al., 2014. Identification of direct and indirect social network effects in the pathophysiology of insulin resistance in obese human subjects. *PloS one*, 9(4), p.e93860.
- Higashi, Y. et al., 2012. Aging, Atherosclerosis, and IGF-1. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 67A(6), pp.626-639.
- Higashi, Y. et al., 2010. IGF-1, oxidative stress and atheroprotection. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(4), pp.245-254.
- Higashi, Y et al., 2001. Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. *American journal of hypertension*, 14(10), pp.1038-45.
- Hisamoto, K. et al., 2001. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 276(5), pp.3459-67.

- Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G., 2006. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, 25(51), pp.6706-16.
- Homanics, G.E. et al., 1995. Mild dyslipidemia in mice following targeted inactivation of the hepatic lipase gene. *The Journal of biological chemistry*, 270(7), pp.2974-80.
- Hong, J. et al., 2011. Different association of circulating levels of adipocyte and epidermal fatty acid-binding proteins with metabolic syndrome and coronary atherosclerosis in Chinese adults. *Atherosclerosis*, 217(1), pp.194-200.
- Hotamisligil, G.S. 2010. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, 140(6), pp.900-917.
- Hotamisligil, G.S. et al., 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5249), pp.665-8.
- Hsueh, W.A., Jackson, S. & Law, R.E., 2001. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-gamma: a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care*, 24(2), pp.392-7.
- Huang, P.L., 2009. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(6), pp.295-302.
- Huang, W. & Hung, M., 2013. Beyond NF-kB activation: nuclear functions of Ikb kinase a. *Journal of Biomedical Science*, 20(1), p.3.
- Hughes, A. et al., 2014. IGF2: an endocrine hormone to improve islet transplant survival. *The Journal of endocrinology*, 221(2), pp.R41-8.
- Huo, Y. & Ley, K., 2001. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta physiologica Scandinavica*, 173(1), pp.35-43.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), pp.673-87.
- Iacobellis, G. et al., 2013. Brown fat expresses adiponectin in humans. *International journal of endocrinology*, 2013, p.126751.
- Ibarguren, M., López, D.J. & Escribá, P.V., 2014. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(6), pp.1518-1528.
- Imai, J. et al., 2008. Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5905), pp.1250-4.
- Ingelsson, E. et al., 2007. Multimarker approach to evaluate the incidence of the metabolic syndrome and longitudinal changes in metabolic risk factors: the Framingham Offspring Study. *Circulation*, 116(9), pp.984-92.
- Isenović, E.R. et al., 2010. Insulin, thrombin, ERK1/2 kinase and vascular smooth muscle cells proliferation. *Current pharmaceutical design*, 16(35), pp.3895-902.

- Ishibashi, J. & Seale, P., 2010. Medicine. Beige can be slimming. *Science* (New York, N.Y.), 328(5982), pp.1113-4.
- Ishibashi, M. et al., 2004. Bone marrow-derived monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is critical in angiotensin II-induced acceleration of atherosclerosis and aneurysm formation in hypercholesterolemic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(11), pp.e174-8.
- Isner, J.M. et al., 1995. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 91(11), pp.2703-11.
- Iwaki, T., Urano, T. & Umemura, K., 2012. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *British journal of haematology*, 157(3), pp.291-298.
- Janssen, J.A.M.J.L. & Varewijck, A.J., 2014. Insulin Analogs and Cancer: A Note of Caution. *Frontiers in Endocrinology*, 5.
- Janßen, H. & Steinbüchel, A., 2014. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), p.7.
- Ježek, J. et al., 2010. Mitochondrial phospholipase A2 activated by reactive oxygen species in heart mitochondria induces mild uncoupling. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(5), pp.737-47.
- Jiang, L. et al., 2014. Increased IR-A/IR-B ratio in non-small cell lung cancers associates with lower epithelial-mesenchymal transition signature and longer survival in squamous cell lung carcinoma. *BMC Cancer*, 14(1), p.131.
- Jin, S.Y. et al., 2014. Insulin regulates monocyte trans-endothelial migration through surface expression of macrophage-1 antigen. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(9), pp.1539-1548.
- Joshi, R.L. et al., 1996. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *The EMBO journal*, 15(7), pp.1542-7.
- Kaneko, K. et al., 2010. Class IA phosphatidylinositol 3-kinase in pancreatic β cells controls insulin secretion by multiple mechanisms. *Cell Metabolism*, 12(6), pp.619-32.
- Kansas, G.S., 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 88(9), pp.3259-87.
- Kapourchali, F.R. et al., 2014. Animal models of atherosclerosis. *World journal of clinical cases*, 2(5), pp.126-32.
- Karagiannis, G.S. et al., 2013. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of oxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation. *BMC Cardiovascular Disorders*, 13(1), p.4.
- Karin, M. & Delhase, M., 2000. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in immunology*, 12(1), pp.85-98.

- Kasuga, M., Karlsson, F.A. & Kahn, C.R., 1982a. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* (New York, N.Y.), 215(4529), pp.185-7.
- Kasuga, M., Zick, Y., et al., 1982b. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature*, 298(5875), pp.667-9.
- Kato, H. et al., 2006. Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(1), pp.224-30.
- Katrina et al., 2014. Increasing Maternal Body Mass Index Is Associated with Systemic Inflammation in the Mother and the Activation of Distinct Placental Inflammatory Pathways. *Biology of Reproduction*.
- Keidar, S. et al., 2001. Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(9), pp.1464-9.
- Khan, B.V. et al., 1995. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 95(3), pp.1262-70.
- Khatib, S. & Vaya, J., 2014. Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), pp.709-713.
- Kido, Y. et al., 2000. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *The Journal of clinical investigation*, 105(2), pp.199-205.
- Kikusato, M. & Toyomizu, M., 2013. Crucial Role of Membrane Potential in Heat Stress-Induced Overproduction of Reactive Oxygen Species in Avian Skeletal Muscle Mitochondria. Moran, ed. *PloS one*, 8(5), p.e64412.
- Kim, F. et al., 2008. Vascular Inflammation, Insulin Resistance, and Reduced Nitric Oxide Production Precede the Onset of Peripheral Insulin Resistance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(11), pp.1982-1988.
- Kim, H., Park, K., Koo, T.B., Huh, S. & Lee, I., 2007. The modulating effects of the overexpression of uncoupling protein 2 on the formation of reactive oxygen species in vascular cells. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77(3), pp.S46-S48.
- Klingenberg, M. & Huang, S.G., 1999. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochimica et biophysica acta*, 1415(2), pp.271-96.
- Ko, F.N. et al., 1995. Characterization of the thromboxane (TP-) receptor subtype involved in proliferation in cultured vascular smooth muscle cells of rat. *British Journal of Pharmacology*, 116(2), pp.1801-8.
- Kobayashi, M. et al., 2005. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 12(3), pp.138-42.

- Kola, B. et al., 2006. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 17(5), pp.205-15.
- Krauss, S. et al., 2003. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic β cell dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), pp.1831-1842.
- Krogmann, A. et al., 2011. Inflammatory response of human coronary artery endothelial cells to saturated long-chain fatty acids. *Microvascular Research*, 81(1), pp.52-9.
- Kulkarni, R.N. et al., 2002. beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nature genetics*, 31(1), pp.111-5.
- Kumada, M. et al., 2003. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(1), pp.85-9.
- Kurihara, T. et al., 2012. Renin-Angiotensin system hyperactivation can induce inflammation and retinal neural dysfunction. *International journal of inflammation*, 2012, p.581695.
- Lamers, D. et al., 2012. Differential impact of oleate, palmitate, and adipokines on expression of NF- κ B target genes in human vascular smooth muscle cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 362(1-2), pp.194-201.
- Lamers, D. et al., 2011. Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signaling in human vascular smooth muscle cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(5), pp.1177-88.
- Langouche, L. et al., 2005. Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *The Journal of clinical investigation*, 115(8), pp.2277-86.
- Leamy, A.K. et al., 2014. Enhanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells. *Journal of lipid research*.
- Lee, C. et al., 2014a. Eicosapentaenoic acid protects against palmitic acid-induced endothelial dysfunction via activation of the AMPK/eNOS pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), pp.10334-49.
- Lee, L. et al., 2014b. A Review of Signal Transduction of Endothelin-1 and Mitogen-activated Protein Kinase-related Pain for Nanophysiotherapy. *Journal of physical therapy science*, 26(5), pp.789-92.
- Lee, I. et al., 2013. TNF- α Induces Cytosolic Phospholipase A2 Expression in Human Lung Epithelial Cells via JNK1/2- and p38 MAPK-Dependent AP-1 Activation G. Liu, ed. *PLoS one*, 8(9), p.e72783.
- Lee, J.Y. et al., 2004. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *The Journal of biological chemistry*, 279(17), pp.16971-9.

- Lee, J.Y. et al., 2003. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of lipid research*, 44(3), pp.479-86.
- Lewis, P. et al., 2007. Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 115(16), pp.2178-87.
- Ley, Klaus. 2003. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 9(6), pp.263-8.
- Li, Chenggang et al., 2006. A comparative study of neovascularisation in atherosclerotic plaques using CD31, CD105 and TGF beta 1. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 73(4), pp.192-7.
- Li, Kexue et al., 2013a. Inhibiting NF- κ B-inducing kinase (NIK): discovery, structure-based design, synthesis, structure-activity relationship, and co-crystal structures. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(5), pp.1238-44.
- Li, Quian. et al., 2013b. Induction of Vascular Insulin Resistance and Endothelin-1 Expression and Acceleration of Atherosclerosis by the Overexpression of Protein Kinase C- Isoform in the Endothelium. *Circulation Research*, 113(4), pp.418-427.
- Li, Li-Xin et al., 2003. Interleukin-1beta swiftly down-regulates UCP-2 mRNA in beta-cells by mechanisms not directly coupled to toxicity. *Cytokine*, 23(4-5), pp.101-7.
- Li, Ling et al., 2009. The adipose triglyceride lipase, adiponectin and visfatin are downregulated by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in vivo. *Cytokine*, 45(1), pp.12-9.
- Liang, H. et al., 2011. Palmitic acid-induced apoptosis in pancreatic β -cells is increased by liver X receptor agonist and attenuated by eicosapentaenoate. In vivo (Athens, Greece), 25(5), pp.711-8.
- Libby, P. et al., 1995. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 25 Suppl 2, pp.S9-12.
- Lim, J.H. et al., 2012. Differential Association of Uncoupling Protein 2 Polymorphisms with Pattern Identification among Korean Stroke Patients: A Diagnostic System in Traditional Korean Medicine. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2012, p.532078.
- Lingohr, M.K., Buettner, R. & Rhodes, C.J., 2002a. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends in Molecular Medicine*, 8(8), pp.375-84.
- Lingohr, M.K. et al., 2002b. Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF-alpha or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes*, 51(4), pp.966-76.
- Liu, J. et al., 2013. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *Journal of diabetes research*, 2013, p.585897.

- Liu, L. et al., 2014. A role for diallyl trisulfide in mitochondrial antioxidative stress contributes to its protective effects against vascular endothelial impairment. *European Journal of Pharmacology*, 725, pp.23-31.
- Lorenzo, O. et al., 2013. Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy. *Mediators of inflammation*, 2013, p.461967.
- Loskutoff, D.J., Sawdey, M. & Mimuro, J., 1989. Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Progress in hemostasis and thrombosis*, 9, pp.87-115.
- Luchtefeld, M. et al., 2005. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(1), pp.183-8.
- Lytton, J., Westlin, M. & Hanley, M.R., 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of biological chemistry*, 266(26), pp.17067-71.
- Ma, L. et al., 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121(2), pp.179-93.
- MacEwan, D.J., 2002. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *British Journal of Pharmacology*, 135(4), pp.855-75.
- Malingriau, E.A. et al., 2013. Fatty Acids are Key in 4-Hydroxy-2-Nonenal-Mediated Activation of Uncoupling Proteins 1 and 2 H. Tajmir-Riahi, ed. *PLoS one*, 8(10), p.e77786.
- Mallat, Z. et al., 1999. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 103(3), pp.421-7.
- Manrique, C., Lastra, G. & Sowers, J.R., 2014. New insights into insulin action and resistance in the vasculature. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1311(1), pp.138-150.
- Marchesi, C. et al., 2009. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension*, 54(6), pp.1384-92.
- Martin, A.G. & Fresno, M., 2000. Tumor necrosis factor-alpha activation of NF-kappa B requires the phosphorylation of Ser-471 in the transactivation domain of c-Rel. *The Journal of biological chemistry*, 275(32), pp.24383-91.
- Martin-Ventura, J.L., 2004. NF- B Activation and Fas Ligand Overexpression in Blood and Plaques of Patients With Carotid Atherosclerosis: Potential Implication in Plaque Instability. *Stroke*, 35(2), pp.458-463.
- Mateo, T. et al., 2007. A critical role for TNFalpha in the selective attachment of mononuclear leukocytes to angiotensin-II-stimulated arterioles. *Blood*, 110(6), pp.1895-902.
- Mattson, M.P., 2010. Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Research Reviews*, 9(1), pp.69-76.

- Mauer, J. et al., 2014. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nature immunology*, 15(5), pp.423-30.
- Mayneris-Perxachs, J. et al., 2014a. Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and their relation with the metabolic syndrome in a population at high risk of cardiovascular disease. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 33(1), pp.90-7.
- Mayneris-Perxachs, J., et al., 2014b. Effects of 1-year intervention with a mediterranean diet on plasma Fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk. *PloS one*, 9(3), p.e85202.
- Mazurek, T. et al., 2003. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*, 108(20), pp.2460-6.
- McCole, D.F., 2013. Phosphatase regulation of intercellular junctions. *Tissue Barriers*, 2(1), p.e26713.
- McGuire, P.G. & Orkin, R.W., 1987. Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrata. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 57(1), pp.94-105.
- Meijer, R.I. et al., 2011. Perivascular adipose tissue and its role in type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Current diabetes reports*, 11(3), pp.211-7.
- Merial, C. et al., 2000. Nitric oxide-dependent downregulation of adipocyte UCP-2 expression by tumor necrosis factor-alpha. *American journal of physiology. Cell physiology*, 279(4), pp.C1100-6.
- Michael, M.D. et al., 2000. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Molecular cell*, 6(1), pp.87-97.
- Michell, B.J. et al., 2002. Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *The Journal of biological chemistry*, 277(44), pp.42344-51.
- Minami, K. & Seino, S. 2013. Current status of regeneration of pancreatic β -cells. *Journal of Diabetes Investigation*, 4(2), pp.131-41.
- Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A., 1990. Relationship between prostacyclin and nitric oxide in the thrombotic process. *Thrombosis research. Supplement*, 11, pp.3-13.
- Moon, H., Batriel, S. & Mantzoros, C.S., 2014. Alpha linolenic acid and oleic acid additively down-regulate malignant potential and positively cross-regulate AMPK/S6 axis in OE19 and OE33 esophageal cancer cells. *Metabolism: clinical and experimental*.
- Morimoto, S., Cassell, M.D. & Sigmund, C.D., 2002. The brain renin-angiotensin system in transgenic mice carrying a highly regulated human renin transgene. *Circulation Research*, 90(1), pp.80-6.

- Motamed, K. et al., 2002. Inhibition of PDGF-stimulated and matrix-mediated proliferation of human vascular smooth muscle cells by SPARC is independent of changes in cell shape or cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 84(4), pp.759-71.
- Moukdar, F. et al., 2009. Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice. *Journal of lipid research*, 50(1), pp.59-70.
- Muniyappa, R. & Sowers, J.R., 2013. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14(1), pp.5-12.
- Murabito, J.M. et al., 2013. Depressive symptoms are associated with visceral adiposity in a community-based sample of middle-aged women and men. *Obesity*, 21(8), pp.1713-1719.
- Muretta, J.M., Romenskaia, I. & Mastick, C.C., 2007. Insulin Releases Glut4 from Static Storage Compartments into Cycling Endosomes and Increases the Rate Constant for Glut4 Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), pp.311-323.
- Murphy, R., Ellard, S. & Hattersley, A.T., 2008. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism*, 4(4), pp.200-13.
- Murumalla, R.K. et al., 2012. Fatty acids do not pay the toll: effect of SFA and PUFA on human adipose tissue and mature adipocytes inflammation. *Lipids in Health and Disease*, 11(1), p.175.
- Myers, M. et al., 1992. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), pp.10350-4.
- Nabben, M. & Hoeks, J., 2008. Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism. *Physiology & behavior*, 94(2), pp.259-69.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y. & Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological reviews*, 79(4), pp.1193-226.
- Navarro, A. et al., 2014. Human adipose tissue-resident monocytes exhibit an endothelial-like phenotype and display angiogenic properties. *Stem cell research & therapy*, 5(2), p.50.
- Newsholme, P. et al., 2007. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *The Journal of physiology*, 583(Pt 1), pp.9-24.
- Nibbelink, M. et al., 2001. Brown Fat UCP1 Is Specifically Expressed in Uterine Longitudinal Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp.47291-47295.
- Niu, Z. et al., 2014. Associations between insulin resistance, free fatty acids, and oocyte quality in polycystic ovary syndrome during in vitro fertilization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, p.jc20133942.

- Nolan, C.J., Damm, P. & Prentki, M., 2011. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *The Lancet*, 378(9786), pp.169-181.
- O'Brien, K.D. et al., 1996. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*, 93(4), pp.672-82.
- Oberbach, A. et al., 2012. Free Fatty Acid Palmitate Impairs the Vitality and Function of Cultured Human Bladder Smooth Muscle Cells H. Koul, ed. *PloS one*, 7(7), p.e41026.
- Ohishi, M. et al., 2010. Increased expression and co-localization of ACE, angiotensin II AT(1) receptors and inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic human coronary arteries. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 2(2), pp.111-24.
- Ohmura, K. et al., 2010. Natural Killer T Cells Are Involved in Adipose Tissues Inflammation and Glucose Intolerance in Diet-Induced Obese Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(2), pp.193-199.
- Okura, Y. et al., 2001. Decreased expression of insulin-like growth factor-1 and apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaque. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(10), pp.1777-89.
- Olszanecka-Glinianowicz, M. et al., 2004. Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism: clinical and experimental*, 53(10), pp.1268-73.
- Oppenheim, J.J. et al., 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene 'intercrine' cytokine family. *Annual review of immunology*, 9, pp.617-48.
- Ouellet, V. et al., 2012. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *The Journal of clinical investigation*, 122(2), pp.545-52.
- Padgett, L.E. et al., 2013. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281(1), pp.16-35.
- Pandini, G. et al., 1999. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5(7), pp.1935-44.
- Park, J. et al., 2005. The effects of the overexpression of recombinant uncoupling protein 2 on proliferation, migration and plasminogen activator inhibitor 1 expression in human vascular smooth muscle cells. *Diabetologia*, 48(5), pp.1022-8.

- Pedersen, S.B. et al., 2001. Insulin and contraction directly stimulate UCP2 and UCP3 mRNA expression in rat skeletal muscle in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(1), pp.19-25.
- Penn, M.S., Saidel, G.M. & Chisolm, G.M., 1994. Relative significance of endothelium and internal elastic lamina in regulating the entry of macromolecules into arteries in vivo. *Circulation Research*, 74(1), pp.74-82.
- Perkins, N.D., 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), pp.49-62.
- Phizicky, E.M. & Fields, S., 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological reviews*, 59(1), pp.94-123.
- Polanco, J.I. et al., 1996. Induction of insulin-like growth factor receptor (IGF IR) mRNA levels by low density lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(3), pp.917-22.
- Police, S.B. et al., 2009. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(10), pp.1458-64.
- Potenza, M.A., Addabbo, F. & Montagnani, M., 2009. Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 297(3), pp.E568-E577.
- Pouysségur, J., Volmat, V. & Lenormand, P., 2002. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), pp.755-63.
- Previs, S.F. et al., 2000. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 275(50), pp.38990-4.
- Privratsky, J.R. & Newman, P.J., 2014. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell and tissue research*, 355(3), pp.607-19.
- Properzi, G. et al., 1995. Early increase precedes a depletion of endothelin-1 but not of von Willebrand factor in cutaneous microvessels of diabetic patients. A quantitative immunohistochemical study. *The Journal of pathology*, 175(2), pp.243-52.
- Pérez, L.M. et al., 2013. Metabolic rescue of obese adipose-derived stem cells by Lin28/Let7 pathway. *Diabetes*, 62(7), pp.2368-79.
- Pueyo, M.E. et al., 2000. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(3), pp.645-51.
- Putcha, G.V. et al., 2003. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*, 38(6), pp.899-914.

- Quinn, M.T. et al., 1987. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(9), pp.2995-8.
- Sen R. & Baltimore, D., 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46(5), pp.705-16.
- Rahman, A. & Fazal, F., 2011. Blocking NF- B: An Inflammatory Issue. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8(6), pp.497-503.
- Rajapakse, N.W. et al., 2013. Insulin-Mediated Activation of the L-Arginine Nitric Oxide Pathway in Man, and Its Impairment in Diabetes V. Sanchez-Margalet, ed. *PloS one*, 8(5), p.e61840.
- Rajendran, P. et al., 2014. Antioxidants and human diseases., pp.1-16.
- Ramsden, D.B. et al., 2012. Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain and Behavior*, 2(4), pp.468-478.
- Rangaswamy, S. et al., 1997. Exogenous oxidized low-density lipoprotein injures and alters the barrier function of endothelium in rats in vivo. *Circulation Research*, 80(1), pp.37-44.
- Rask-Madsen, C. et al., 2010. Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. *Cell Metabolism*, 11(5), pp.379-89.
- Rath, P.C. & Aggarwal, B.B., 1999. TNF-induced signaling in apoptosis. *Journal of clinical immunology*, 19(6), pp.350-64.
- Reaven, G.M., 2005. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva medica*, 47(4), pp.201-10.
- Resink, T.J. et al., 1990. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 168(3), pp.1303-10.
- Rittig, K. et al., 2008. Perivascular fatty tissue at the brachial artery is linked to insulin resistance but not to local endothelial dysfunction. *Diabetologia*, 51(11), pp.2093-9.
- Romeo, G.R., Lee, J. & Shoelson, S.E., 2012. Metabolic Syndrome, Insulin Resistance, and Roles of Inflammation - Mechanisms and Therapeutic Targets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), pp.1771-1776.
- Rose-John, S., 2012. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*, 8(9), pp.1237-47.
- Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M., 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121), pp.847-853.
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*, 340(2), pp.115-26.

- Ross, R., 1997. Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis*, 131 Suppl, pp.S3-4.
- Ross, R., 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362(6423), pp.801-9.
- Ross, R., 1986. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *The New England journal of medicine*, 314(8), pp.488-500.
- Rousset, S. et al., 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, 53 Suppl 1, pp.S130-5.
- Roy, V.K. et al., 2013. Plasma free Fatty Acid concentrations as a marker for acute myocardial infarction. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 7(11), pp.2432-4.
- Ruiz-Ortega, M. et al., 2001. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension*, 38(6), pp.1382-7.
- Russell, W.C., Newman, C. & Williamson, D.H., 1975. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*, 253(5491), pp.461-2.
- Ryu, J. et al., 2004. Overexpression of uncoupling protein 2 in THP1 monocytes inhibits beta2 integrin-mediated firm adhesion and transendothelial migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(5), pp.864-70.
- Sacks, H.S. & Fain, J.N., 2011. Human epicardial fat: what is new and what is missing? *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 38(12), pp.879-87.
- Salvadó, L. et al., 2013. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia*, 56(6), pp.1372-1382.
- Samad, F. & Ruf, W., 2013. Inflammation, obesity, and thrombosis. *Blood*, 122(20), pp.3415-22.
- Sambrook, J. & Gething, M.J., 1989. Protein structure. Chaperones, papeones. *Nature*, 342(6247), pp.224-5.
- Samieri, C. et al., 2013. The association between dietary patterns at midlife and health in aging: an observational study. *Annals of internal medicine*, 159(9), pp.584-91.
- Sanan, D.A. et al., 1998. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), pp.4544-9.
- Sandireddy, R. et al., 2014. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. *International journal of endocrinology*, 2014, p.674987.
- Sansbury, B.E. & Hill, B.G., 2014. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide., pp.1-17.
- Sanz, P., 2008. AMP-activated protein kinase: structure and regulation. *Current protein & peptide science*, 9(5), pp.478-92.

- Sarbasov, D. & Sabatini, D.M., 2005. Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *The Journal of biological chemistry*, 280(47), pp.39505-9.
- Sauer, B., 1993. Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods in enzymology*, 225, pp.890-900.
- Schrauwen, P. & Hesselink, M., 2002. UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *The Journal of experimental biology*, 205(Pt 15), pp.2275-85.
- Schrauwen, P. et al., 2003. Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(15), pp.2272-4.
- Schwartz, S.M., 1999. The definition of cell type. *Circulation Research*, 84(10), pp.1234-5.
- Sciacca, L. et al., 1999. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene*, 18(15), pp.2471-9.
- Seino, S & Bell, G.I., 1989. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(1), pp.312-6.
- SenBanerjee, S. et al., 2011. IKK β regulates essential functions of the vascular endothelium through kinase-dependent and -independent pathways. *Nature Communications*, 2, p.318.
- Sengenès, C. et al., 2007. The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue. *Journal of internal medicine*, 262(4), pp.415-21.
- Senn, J.J., 2006. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *The Journal of biological chemistry*, 281(37), pp.26865-75.
- Sesti, G. et al., 2001. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(12), pp.2099-111.
- Sesti, G. et al., 1994. Role of the exon 11 of the insulin receptor gene on insulin binding identified by anti-peptide antibodies. *Molecular and cellular endocrinology*, 101(1-2), pp.121-7.
- Sheehan, M. et al., 2002. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Molecular pharmacology*, 61(5), pp.953-63.
- Shen, H. et al., 2013. Saturated Fatty Acid Palmitate Aggravates Neointima Formation by Promoting Smooth Muscle Phenotypic Modulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(11), pp.2596-2607.
- Shen, W., Gaskins, H.R. & McIntosh, M.K., 2014. Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(3), pp.270-280.

- Shi, J. et al., 2012. Serum Liver Fatty Acid Binding Protein Levels Correlate Positively with Obesity and Insulin Resistance in Chinese Young Adults H. Xu, ed. *PloS one*, 7(11), p.e48777.
- Siddle, K., 2011. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *Journal of Molecular Endocrinology*, 47(1), pp.R1-R10.
- Simon-Areces, J. et al., 2012. UCP2 induced by natural birth regulates neuronal differentiation of the hippocampus and related adult behavior. *PloS one*, 7(8), p.e42911.
- Singh, R., Devi, S. & Gollen, R., 2014. Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidemia: larger-than-life. *Diabetes/metabolism research and reviews*.
- Sleeman, M.W. et al., 2005. Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nature Medicine*, 11(2), pp.199-205.
- Smathers, R.L. & Petersen, D.R., 2011. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Human genomics*, 5(3), pp.170-91.
- Sowers, J.R, 2004. Insulin resistance and hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 286(5), pp.H1597-602.
- Stark, M.J. et al., 2012. Localisation and characterisation of uncoupling protein-2 (UCP2) in the human preterm placenta. *Placenta*, 33(12), pp.1020-1025.
- Stary, H.C., 1994. Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic research in cardiology*, 89 Suppl 1, pp.17-32.
- Steffan, N.M. et al., 1995. Regulation of I κ B alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(10), pp.4685-91.
- Steinberg, H.O. & Baron, A.D., 2002. Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia*, 45(5), pp.623-34.
- Steinberg, D., 1997. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, 95(4), pp.1062-71.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J. & van Haeften, T.W., 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), pp.1333-1346.
- Tabit, C.E. et al., 2010. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11(1), pp.61-74.
- Tahrani, A.A. et al., 2011. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. *The Lancet*, 378(9786), pp.182-197.
- Takano, M. et al., 2010. The effect of systemic anti-tumor necrosis factor-alpha treatment on *Porphyromonas gingivalis* infection in type 2 diabetic mice. *Archives of oral biology*, 55(5), pp.379-84.

- Takaoka, M. et al., 2010. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(8), pp.1576-82.
- Tamemoto, H. et al., 1994. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, 372(6502), pp.182-6.
- Tang, E.D. et al., 2003. Roles for homotypic interactions and transautophosphorylation in I κ B kinase beta (IKK β) activation [corrected]. *The Journal of biological chemistry*, 278(40), pp.38566-70.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. & Kahn, R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), pp.85-96.
- Tedder, T.F., Steeber, D.A. & Pizcueta, P., 1995. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *The Journal of experimental medicine*, 181(6), pp.2259-64.
- Teruel, T. et al., 1998. Inhibition of PI 3-kinase and RAS blocks IGF-I and insulin-induced uncoupling protein 1 gene expression in brown adipocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 176(1), pp.99-109.
- Thüsen, J.H. et al., 2011. IGF-1 Has Plaque-Stabilizing Effects in Atherosclerosis by Altering Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. *The American Journal of Pathology*, 178(2), pp.924-934.
- Tian, X.Y., et al., 2012. Uncoupling Protein-2 Protects Endothelial Function in Diet-Induced Obese Mice. *Circulation Research*, 110(9), pp.1211-1216.
- Toschi, V. et al., 1997. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 95(3), pp.594-9.
- Travis, J. & Salvesen, G., 1983. Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors. *Behring Institute Mitteilungen*, (73), pp.56-65.
- Valverde, A.M. et al., 2003. Insulin-induced up-regulated uncoupling protein-1 expression is mediated by insulin receptor substrate 1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in fetal brown adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 278(12), pp.10221-31.
- van Gils, J.M., Zwaginga, J.J. & Hordijk, P.L., 2009. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *Journal of leukocyte biology*, 85(2), pp.195-204.
- van der Vusse, G.J., 2009. Albumin as fatty acid transporter. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 24(4), pp.300-7
- Vaughan, D.E., Lazos, S.A. & Tong, K., 1995. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *The Journal of clinical investigation*, 95(3), pp.995-1001.

- Vega-Avila, E. & Pugsley, M.K., 2011. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 54, pp.10-4.
- Vella, V. et al., 2002. A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates growth of thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(1), pp.245-54.
- Vicent, D. et al., 2003. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 111(9), pp.1373-80.
- Viedt, C. et al., 2000. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(4), pp.940-8.
- Vigneri, R., Squatrito, S. & Sciacca, L., 2010. Insulin and its analogs: actions via insulin and IGF receptors. *Acta Diabetologica*, 47(4), pp.271-278.
- Wan, F. & Lenardo, M.J., 2010. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell research*, 20(1), pp.24-33.
- Wang, X. et al., 2011. ROS-activated p38 MAPK/ERK-Akt cascade plays a central role in palmitic acid-stimulated hepatocyte proliferation. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), pp.539-551.
- Wang, B. & Trayhurn, P., 2006. Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 452(4), pp.418-27.
- Wegener, E. & Krappmann, D., 2008. Dynamic protein complexes regulate NF-kappaB signaling. *Handbook of experimental pharmacology*, (186), pp.237-59.
- Wei, M. et al., 1998. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*, 21(7), pp.1167-72.
- Whittaker, J. et al., 2002. Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor. *The Journal of biological chemistry*, 277(49), pp.47380-4.
- Wieser, V., Moschen, A.R. & Tilg, H., 2013. Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 61(2), pp.119-25.
- Winkles, J.A. et al., 1993. Endothelin-1 and endothelin receptor mRNA expression in normal and atherosclerotic human arteries. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 191(3), pp.1081-8.
- Wohlrab, H., 2010. Homodimeric intrinsic membrane proteins. Identification and modulation of interactions between mitochondrial transporter (carrier) subunits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), pp.746-750.

- Wrede, C.E. et al., 2002. Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *The Journal of biological chemistry*, 277(51), pp.49676-84.
- Wu, H. et al., 2011. Different effects of low- and high-dose insulin on ROS production and VEGF expression in bovine retinal microvascular endothelial cells in the presence of high glucose. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 249(9), pp.1303-1310.
- Wu, J. et al., 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), pp.366-76.
- Yamaoka, S. et al., 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell*, 93(7), pp.1231-40.
- Yang, Y., Tang, L. & Wei, W., 2013. Prostanoids receptors signaling in different diseases/cancers progression. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 33(1), pp.14-27.
- Ylä-Herttuala, S. et al., 1991. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(12), pp.5252-6.
- Yonezawa, T. et al., 2008. Regulation of uncoupling protein 2 expression by long-chain fatty acids and hormones in bovine mammary epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375(2), pp.280-5.
- Zaina, S., 2002. Insulin-like Growth Factor II Plays a Central Role in Atherosclerosis in a Mouse Model. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), pp.4505-4511.
- Zaina, S. et al., 2002. Insulin-like Growth Factor II Plays a Central Role in Atherosclerosis in a Mouse Model. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), pp.4505-4511.
- Zeng, G. & Quon, M.J., 1996. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 98(4), pp.894-8.
- Zernecke, A. & Weber, C., 2014. Chemokines in Atherosclerosis: Proceedings Resumed. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(4), pp.742-750.
- Zernecke, A., Shagdarsuren, E. & Weber, C., 2008. Chemokines in Atherosclerosis: An Update. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(11), pp.1897-1908.
- Zhang, L. et al., 2007. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(5), pp.1087-94.
- Zhang, S.H. et al., 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5081), pp.468-71.

Zhao, Y. et al., 2011. PDGF-induced vascular smooth muscle cell proliferation is associated with dysregulation of insulin receptor substrates. *American journal of physiology. Cell physiology*, 300(6), pp.C1375-85.

Zhou, M. et al., 2012. Upregulation of UCP2 by adiponectin: the involvement of mitochondrial superoxide and hnRNP K. *PloS one*, 7(2), p.e32349.

Zhou, Y. et al., 2013. Saturated fatty acid induces insulin resistance partially through nucleotide-binding oligomerization domain 1 signaling pathway in adipocytes. *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsüeh k'o hsüeh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences*, 28(4), pp.211-7.

Zibara, K. et al., 2000. Modulation of expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in aortic arch lesions of apolipoprotein E-deficient compared with wild-type mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(10), pp.2288-96.

9 ANEXOS

ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access

Antagonistic effect of TNF-alpha and insulin on uncoupling protein 2 (UCP-2) expression and vascular damage

Almudena Gómez-Hernández^{1,2,3*}, Liliana Perdomo^{1,2}, Natalia de las Heras⁴, Nuria Beneit^{1,2}, Óscar Escribano^{1,2}, Yolanda F Otero^{1,2}, Carlos Guillén^{1,2}, Sabela Díaz-Castroverde^{1,2}, Beatriz Gozalbo-López^{1,2}, Victoria Cachofeiro⁴, Vicente Lahera⁴ and Manuel Benito^{1,2}

Abstract

Background: It has been reported that increased expression of UCP-2 in the vasculature may prevent the development of atherosclerosis in patients with increased production of reactive oxygen species, as in the diabetes, obesity or hypertension. Thus, a greater understanding in the modulation of UCP-2 could improve the atherosclerotic process. However, the effect of TNF- α or insulin modulating UCP-2 in the vascular wall is completely unknown. In this context, we propose to study new molecular mechanisms that help to explain whether the moderate hyperinsulinemia or lowering TNF- α levels might have a protective role against vascular damage mediated by UCP-2 expression levels.

Methods: We analyzed the effect of insulin or oleic acid in presence or not of TNF- α on UCP-2 expression in murine endothelial and vascular smooth muscle cells. At this step, we wondered if some mechanisms studied *in vitro* could be of any relevance *in vivo*. We used the following experimental models: ApoE^{-/-} mice under Western type diet for 2, 6, 12 or 18 weeks, BATIRKO mice under high-fat diet for 16 weeks and 52-week-old BATIRKO mice with or without anti-TNF- α antibody pre-treatment.

Results: Firstly, we found that TNF- α pre-treatment reduced UCP-2 expression induced by insulin in vascular cells. Secondly, we observed a progressive reduction of UCP-2 levels together with an increase of lipid depots and lesion area in aorta from ApoE^{-/-} mice. *In vivo*, we also observed that moderate hyperinsulinemic obese BATIRKO mice have lower TNF- α and ROS levels and increased UCP-2 expression levels within the aorta, lower lipid accumulation, vascular dysfunction and macrovascular damage. We also observed that the anti-TNF- α antibody pre-treatment impaired the loss of UCP-2 expression within the aorta and relieved vascular damage observed in 52-week-old BATIRKO mice. Finally, we observed that the pretreatment with iNOS inhibitor prevented UCP-2 reduction induced by TNF- α in vascular cells. Moreover, iNOS levels are augmented in aorta from mice with lower UCP-2 levels and higher TNF- α levels.

Conclusions: Our data suggest that moderate hyperinsulinemia in response to insulin resistance or lowering of TNF- α levels within the aorta attenuates vascular damage, this protective effect being mediated by UCP-2 expression levels through iNOS.

Keywords: TNF- α , Insulin, UCP-2, Atherogenesis

* Correspondence: algomezh@ucm.es

¹Biochemistry and Molecular Biology Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

²CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Uncoupling proteins (UCPs) belong to the family of mitochondrial transporter proteins and are important for lowering mitochondrial membrane potential and dissipating metabolic energy as heat, maintenance of respiration, glucose disposal rate, insulin secretion, prevention of reactive oxygen species (ROS) production [1,2]. UCP-1 was the first member identified, expressed primarily in brown adipose tissue and the major contributor to energy expenditure [3]. Other four members of UCP (-2 to -5) family have been identified. In contrast to UCP-4 and -5, human UCP-2 and -3 are both more closely related to UCP-1 [4,5]. UCP-2 is expressed widely and in human is highly expressed in white adipose tissue. Other tissues as skeletal muscle, heart, cell of immune system and vascular cells express considerable amounts of UCP-2 [6]. Recent studies from UCP-2 and -3 knockout mice suggest that both UCPs have uncoupling activity and decreased ROS production in macrophages and skeletal muscle, respectively [7-9]. More recently, a direct role for UCP-2 in the regulation of atherogenesis has been suggested by the observation that bone marrow transplantation from UCP-2-deficient mice to LDLR^{-/-} mice markedly increased atherosclerotic lesion size [10]. Moreover, it has been described that UCP-2 overexpression in the vasculature may prevent the development of atherosclerosis in patients with increased ROS, such as in diabetes, obesity or hypertension [11] and ameliorate hyperglycemia-induced endothelial dysfunction [12]. Furthermore, UCP-2 might be playing an important role in the regulation of energy expenditure and are likely to contribute to obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM). In this regard, several UCP-2 gene polymorphisms were linked to an increased body weight index or obesity in Pima Indians [13,14] and in Balinese population [15] or with insulin resistance or T2DM [16-18]. Thus, reduced UCP gene expression has been found in adipose tissue of obese subjects and in the first-degree relatives of T2DM patients. On the other hand, both obese and diabetic patients have associated vascular complications such as atherosclerosis [19,20], insulin resistance with hyperinsulinemia and elevated circulating TNF- α levels [21]. To get a new insight on that UCP-2 protective effect on the vasculature, we have studied new molecular mechanisms that help to explain whether the moderate hyperinsulinemia or reduction TNF- α levels might have a protective role against vascular damage mediated by UCP-2 modulation. Firstly, we have analyzed the effect of insulin and/or TNF- α on UCP-2 levels in endothelial and vascular smooth muscle cells. After that, we wondered if some mechanisms studied *in vitro* could be of any relevance *in vivo*. We used the following experimental models: ApoE^{-/-} mice at 8, 12, 18 or 24 weeks of age, BATIRKO mice under high-fat diet for 16 weeks and 52-wk-old

BATIRKO mice with or without anti-TNF- α treatment to address the relationship between UCP-2 expression, or lipid accumulation, or vascular damage, or oxidative stress, or insulin or TNF- α plasma levels. Finally, we searched the role of iNOS in the inhibition of UCP-2 expression by TNF- α .

Methods

Cell culture

Primary vascular smooth muscle cells (VSMC) were obtained from thoracic aorta arteries, immortalized and cultured as described previously [22]. Endothelial cell line, SVEC4-10EE2 (clone 2167) was purchased from ATCC and was cultured in DMEM medium supplemented with 10% of horse bovine serum, respectively. Both cell lines were growth-arrested by incubation in medium without serum for 5 h, and then incubated with the corresponding stimuli. For experiments *in vitro*, we have used TNF- α (10 ng/mL), insulin (10 nmol/L), oleate (1 mmol/L) and L-NAME (1 mmol/L).

Experimental models

Male mice were maintained in the Animal Care Facility under the standard conditions of temperature and 12 h light/dark cycle. All animals from three experimental models used are under C57BL/6 genetic background. Male ApoE^{-/-} knockout mice and their control mice were fed a Western type diet (A04 + 21% kcal from fat) at six week-age for 2, 6, 12 or 18 weeks respectively. Male BATIRKO mice [22] were fed on high-fat diet (A04 + 61% kcal from fat) for 16 weeks or standard diet (3% calories from fat, A04) for 52 weeks. Moreover, one group of 52-wk-old BATIRKO mice were treated with LEAF purified anti-TNF- α (MP6-XT22, Bio-Legend, San Diego, CA) (50 μ g/mouse ip.) every 3 days for 6 weeks as previously described [23]. All animal experimentation described in this manuscript was conducted according with accepted standards of human animal care, as approved by the corresponding institutional committee. The investigation also conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and in accordance with The ARRIVE Guideline for Reporting Animal research [24].

Western blot

Western blot analyses were performed on protein extracts from VSMCs, ECs or aorta artery as previously described [25]. The antibodies used were anti-phospho-AKT (T308), AKT, p-p70S6K (T389), p70S6K, p-p44/42 (S202/T204) and p44/42 from Cell Signalling, anti-UCP-2 was from Calbiochem and anti- β -actin or α -tubulin was from Sigma-Aldrich Corp.

RNA extraction and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from ECs, VSMCs or aorta artery from mice by TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA). The gene expression was analyzed by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) as described [25].

Analytical procedures

Plasma levels of insulin and TNF- α were analyzed using ELISA kits (Millipore and SABioSciences, Frederick, MD, respectively).

Histological analysis

Aortic roots were OCT-embedded and sections of 7 μ m interval were Oil-Red-O/hematoxylin stained to measure lipid depot. The lesion size on aortic root was also measured as described [22]. Macrophages and nitrotyrosine levels were detected by immunoperoxidase with rat anti-mouse F4/80 antigen (MCA497GA, AbD serotec) and rabbit anti-nitrotyrosine polyclonal Ab (06-284, Upstate), respectively.

Statistical analysis

All values were expressed as means \pm sem. Data were analyzed using a one-way analysis of variance, followed by a Bonferroni test if differences were noted (SPSS 15.0 program). Spearman's correlation coefficient analysis was used to assess associations between several parameters of experimental model. The null hypothesis was rejected when the p value was less than 0.05.

Results

Differential effect of TNF-alpha and Insulin on UCP-2 expression in vascular cells

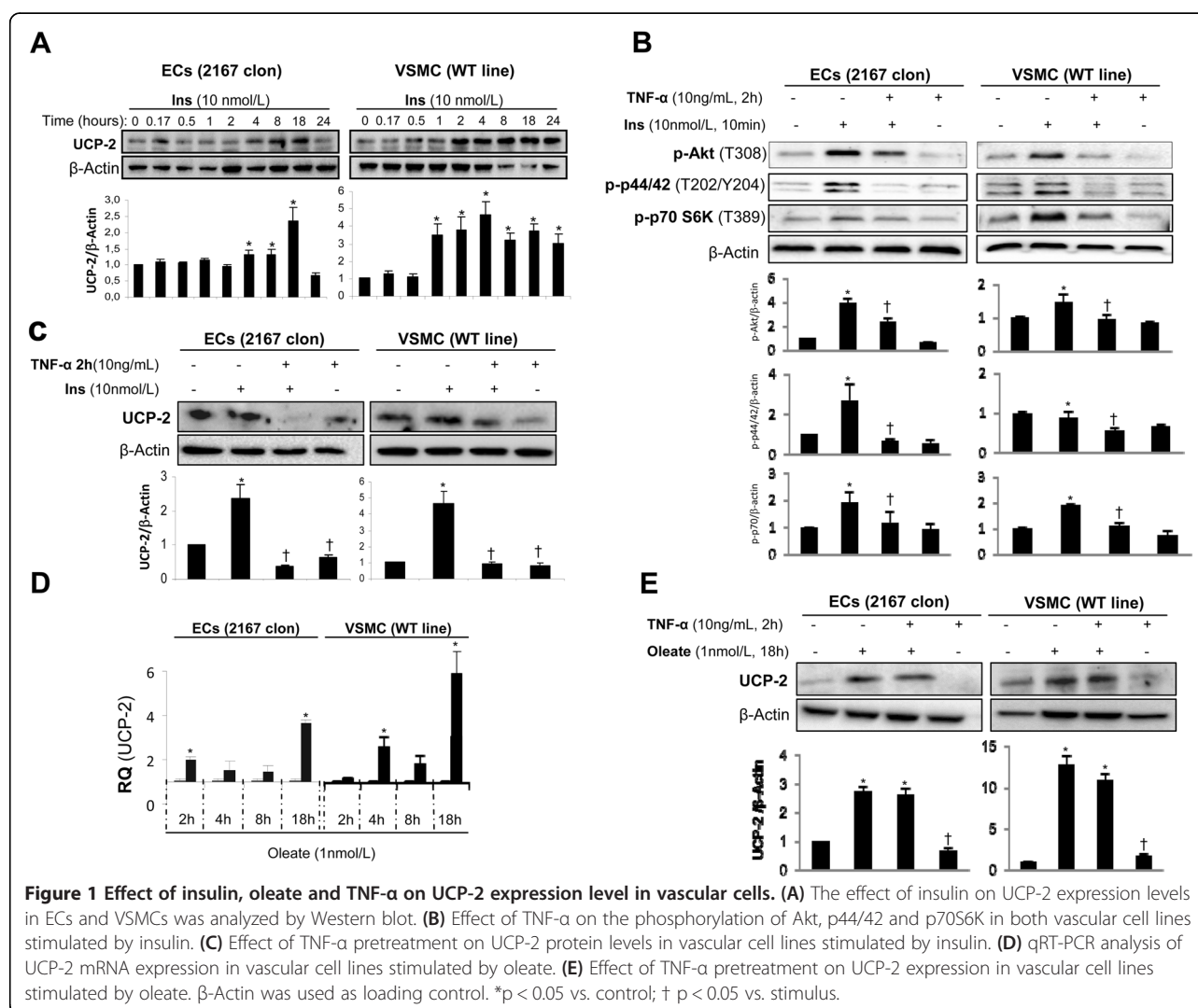
Although it is well-known the protective role of UCP-2 against vascular damage [10], the relationship between insulin or TNF- α with UCP-2 in vascular cells is completely unknown. Thus, we addressed that issue in ECs and VSMCs as two major components of the vascular wall. Firstly, we observed that insulin significantly increased UCP-2 protein levels at 4, 8 and 18 h in ECs and at 1 h through 24 h in VSMCs (Figure 1A). We ascertained that the pre-treatment with 10 ng/mL TNF- α for 2 hours induced insulin resistance in both vascular cells as shown by the significant decreases in the phosphorylation of Akt, p70S6K and p44/42 in cells stimulated with 10 nmol/L insulin for 10 minutes (Figure 1B). Based on these data, we analyzed the effect of TNF- α on UCP-2 protein levels. Thus, 10 ng/mL TNF- α for 2 hours downregulated UCP-2 protein levels in both vascular cells respectively (Figure 1C and E). More importantly, we also demonstrated that TNF- α pre-treatment induced a significant decrease of UCP-2 protein levels in VSMCs and ECs stimulated upon insulin action for 4 h or 18 h, respectively (Figure 1C). At this stage, we compared insulin effect with a well-known

inductor of UCP-2 expression such as oleate [26]. Firstly, we observed a significant increase in UCP-2 expression at mRNA or protein level at 18 h upon oleate treatment in both vascular cell lines respectively (Figure 1D and E). However, TNF- α pre-treatment did not significantly impair UCP-2 protein induced by oleate in both vascular cells respectively (Figure 1E).

Protective role of UCP-2 against lipid accumulation and vascular damage

At this step, we wondered if some mechanisms described in vitro could be of any relevance in vivo. Thus, we explored in vivo the associations between UCP-2 levels and lipid accumulation, or vascular damage, or oxidative stress, or TNF- α levels in the aortic wall, or with circulating insulin levels. We used different mouse models of disease. The first one was ApoE^{-/-} mice and their controls at 8, 12, 18 and 24 wk of age. By Oil-Red-O/hematoxylin staining, we observed that ApoE^{-/-} mice developed progressively higher lesion area with higher lipid content within aortic roots (Figure 2A). We also analyzed by qRT-PCR UCP-2 mRNA expression and its likely relationship with the lesion area or lipid content. Thus, UCP-2 levels augmented significantly within the aorta from 8 week-old ApoE^{-/-} mice as compared with their corresponding controls (Figure 2B). However, UCP-2 levels sharply decreased from 12- through 24-wk-old ApoE^{-/-} mice (Figure 2B). Thus, we established a negative and significant correlation between UCP-2 levels and lesion area or lipid depot within the aortic wall (Figure 2C). Additionally, we checked that UCP-2 protein levels were also decreased in 24-wk-old ApoE^{-/-} mice in relation to their controls (Additional file 1: Figure S1A).

The second mouse-model studied was BATIRKO mice under HFD for 16 weeks. These mice lacking IR in BAT-specific manner under STD showed severe brown lipoatrophy, susceptibility to the obesity (mainly in gonadal WAT compartment), glucose intolerance and a defect in insulin secretion [22,27]. Moreover, BATIRKO mice under HFD also showed insulin resistance and more severe glucose intolerance. So, we have phenotypically established two groups of obese BATIRKO mice as characterized by their plasma insulin levels, pancreatic islet area, islet insulin content, and also by their glucose tolerance curves and fasting hyperglycemia. The first group showed compensated insulin resistance (moderately hyperinsulinemic, BATIRKO MH, fasted insulin plasma levels = 1.4 ± 0.2 ng/mL, $p < 0.05$ vs. control group), marked pancreatic beta cell hyperplasia (0.06 ± 0.01 islet area/pancreas area, $p < 0.05$ vs. control group) and higher islet insulin content (0.28 ± 0.02 positive staining/ islet area, $p < 0.05$ vs. control group). A second group showed non-compensated insulin resistance (normoinsulinemic, BATIRKO N, fasted insulin plasma

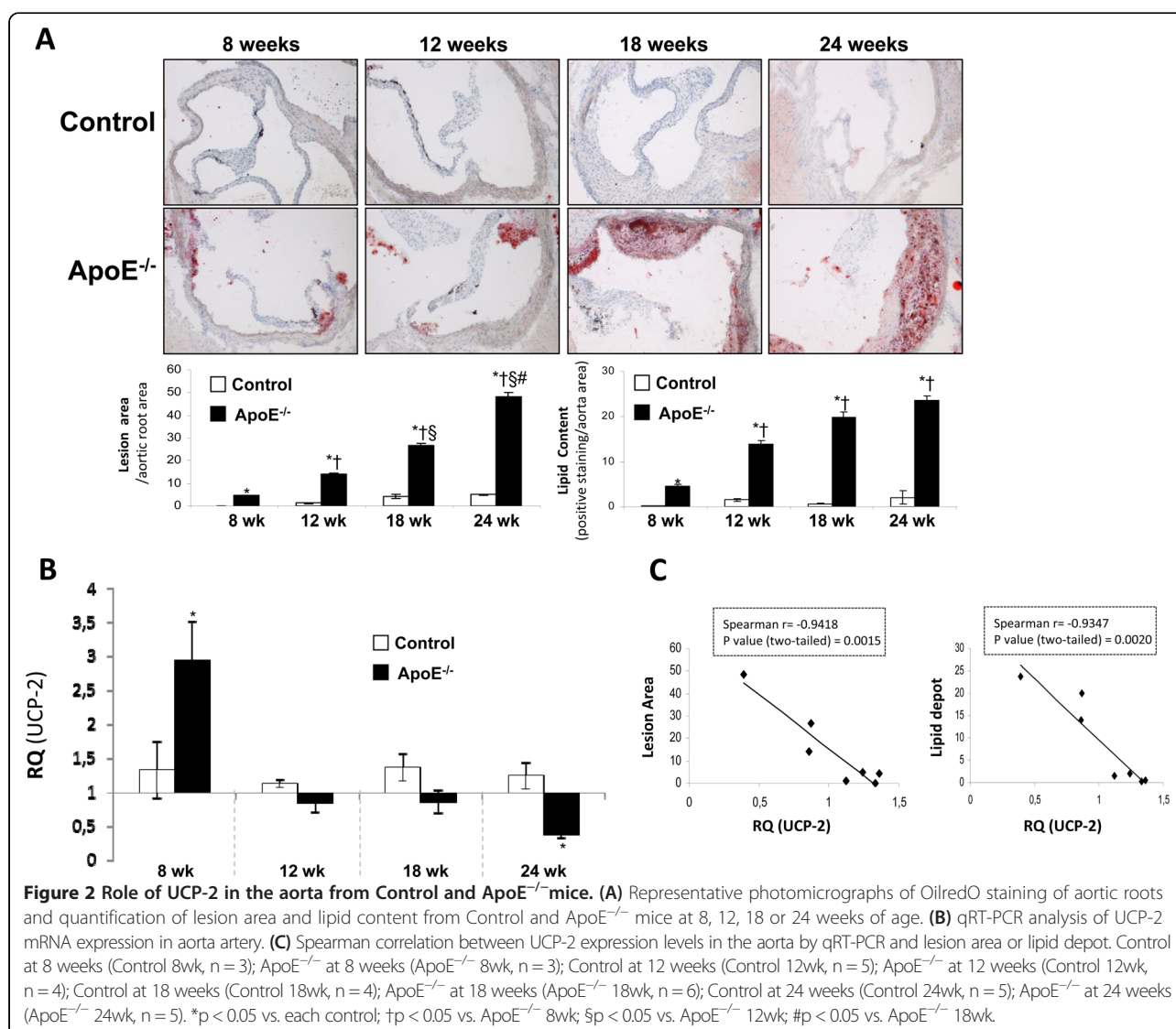


levels = 0.42 ± 0.05 ng/mL, $p < 0.05$ vs. BATIRKO MH), normal islet size (0.02 ± 0.008 islet area/pancreas area, ns. vs. control group) and lower islet insulin content (0.14 ± 0.01 positive staining/islet area, $p < 0.05$ vs. control group). In addition, normoinsulinemic obese BATIRKO mice (N) showed a more severe glucose intolerance and mild fasting hyperglycemia as compared with moderate hyperinsulinemic obese BATIRKO mice (MH) (Fasting glycemia from BATIRKO N = 138 ± 9 mg/dL, $p < 0.05$ vs. control group; fasting glycemia from BATIRKO MH = 123 ± 8 mg/dL and from control group = 111 ± 4 mg/dL). Under this scenario, we observed that BATIRKO MH mice showed a significant increase of UCP-2 levels as compared with control or BATIRKO N mice respectively (Figure 3A and Additional file 1: Figure S1B). At this stage, we explored the relationship between UCP-2 levels within the aortic wall and the vascular damage. Thus, normoinsulinemic obese BATIRKO mice with lower UCP-2 levels in the aorta showed endothelial dysfunction

(Additional file 2: Figure S2A), higher vasoconstrictor response to angiotensin II or TXA₂ (Additional file 2: Figure S2B), higher lipid depots (Figure 3B), higher lesion area and macrophage infiltration in aortic roots (Additional file 2: Figure S2C) as compared with moderate hyperinsulinemic BATIRKO mice. Moreover, we also observed a significant negative correlation between UCP-2 levels and lipid depots or lesion area in the aorta in those animals (Figure 3B).

Relationship between TNF- α and UCP-2 expression levels *in vivo*

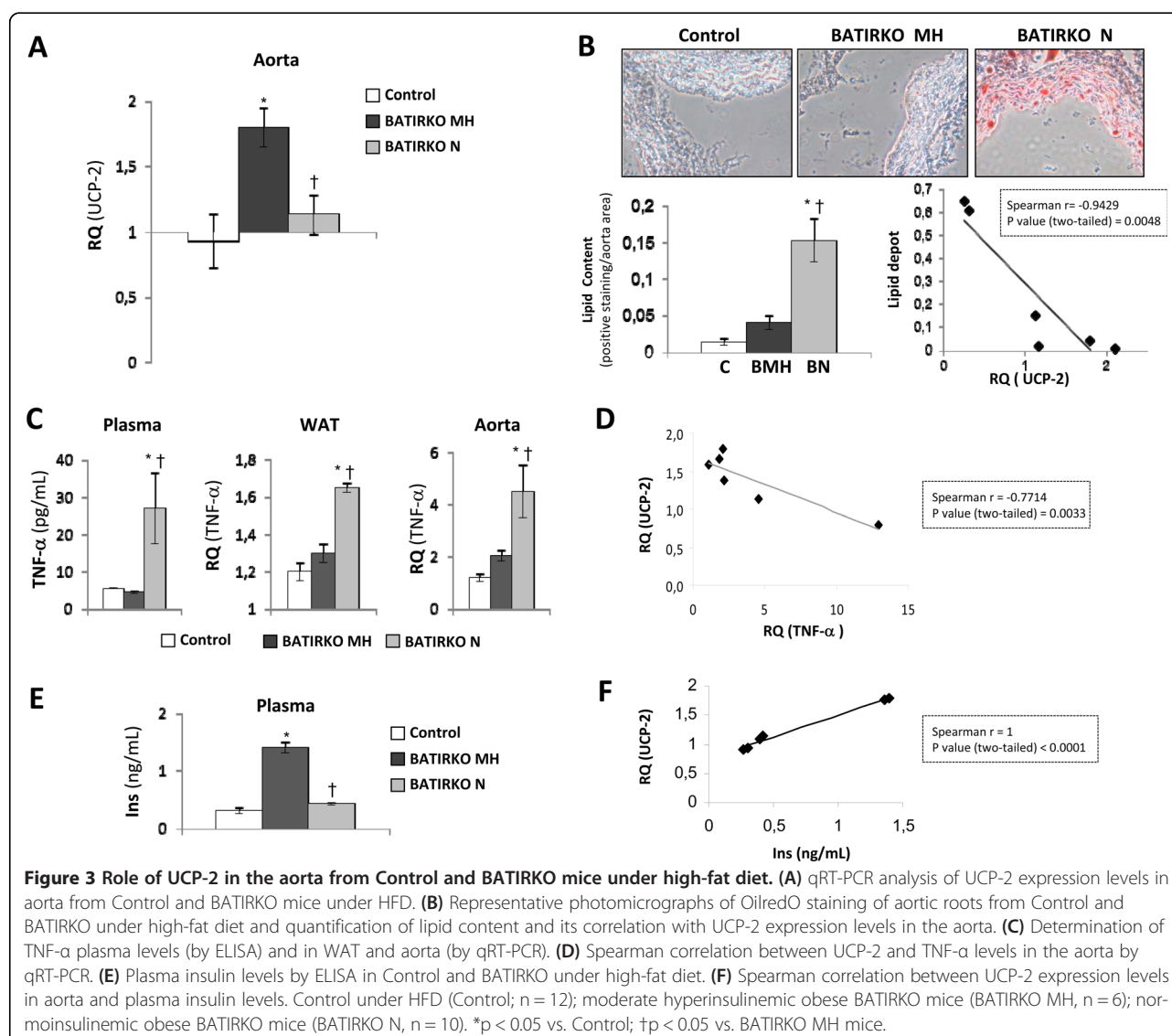
As we had demonstrated *in vitro* that TNF- α might downregulate UCP-2 protein levels in vascular cells, we explored that mechanism in both groups of obese BATIRKO mice in the aorta (Figure 3C). Normoinsulinemic obese BATIRKO mice (N) with lower UCP-2 levels in aorta and higher vascular damage showed a significant increase in TNF- α plasma levels, or expressed in WAT or



aorta as compared with moderate hyperinsulinemic BATIRKO mice (MH) (Figure 3C). Thus, we observed a significant negative correlation between UCP-2 and TNF- α levels in the aorta (Figure 3D). We also explored those levels in 52-week-old BATIRKO mice under standard diet. Those mice showed severe brown lipoatrophy, obesity, hypoinsulinemia, mild fasting hyperglycemia, glucose intolerance, vascular dysfunction, macrophage infiltration, oxidative stress, and a significant increase of gene markers of endothelial activation and inflammation as previously characterized [23], TNF- α playing a major role [23]. Now, we have observed that 52-week-old BATIRKO mice show a significant reduction of UCP-2 expression levels, that UCP-2 lowering in the aorta was precluded by the pre-treatment with anti-TNF- α (Figure 4A and Additional file 1: Figure S1C and D). In addition, a significantly negative correlation between UCP-2 and TNF- α expression levels in the aorta was also observed (Figure 4B).
 254

Effect of insulin on UCP-2 expression levels *in vivo*

At this step, we wondered if UCP-2 overexpression induced by insulin *in vitro* could be of any relevance *in vivo*. For this purpose, we observed that obese BATIRKO mice with moderate hyperinsulinemia had higher UCP-2 levels in aorta and lesser vascular damage than normoinsulinemic obese BATIRKO mice (Figure 3A, B and E and Additional file 1: Figure S1B). Moreover, we established a positive and significant correlation between circulating insulin levels and UCP-2 levels in aorta (Figure 3F). In the third experimental model, we also observed this correlation between insulin and UCP-2 expression levels (Figure 4C). Thus, 52-week-old control group displaying moderate hyperinsulinemia showed a significant increase in UCP-2 expression levels in the aorta (Figure 3A and Additional file 1: Figure S1D). However, 52-week-old BATIRKO mice showing a lower insulinemia manifested a significant reduction of UCP-2 expression



levels and higher vascular alterations (Figure 3A and Additional file 1: Figure S1C and D). On the other hand, UCP-2 might modify atherosclerotic process due to the fact that elevated levels of this protein reduce ROS levels [11]. Thus, we observed a significant decrease of superoxide anion and nitrotyrosine levels in aortic roots from moderate hyperinsulinemic as compared with normoinsulinemic obese BATIRKO mice (Additional file 2: Figure S2C).

Role of iNOS in the UCP-2 downregulation induced by TNF- α

Back to *in vitro* studies, we explored whether the reduction in UCP-2 levels in the aorta induced by TNF- α might be mediated at least in part by iNOS in vascular cells. Thus, we observed by qRT-PCR that TNF- α treatment for 2, 4 and 8 hours induced a significant

robust increase of iNOS mRNA expression in vascular cells (Figure 5A). Next step, we observed that the pre-treatment with iNOS inhibitor (L-NAME) impaired that rising of the UCP-2 expression levels in ECs or VSMCs in response to TNF- α (Figure 5B). These data strongly suggest that TNF- α downregulates UCP-2 expression levels through iNOS expression in the aortic wall. We explored that relationship between iNOS and UCP-2 *in vivo*. Thus, we observed that 18-week-old and mainly 24-week-old ApoE^{-/-} mice showed a significant increase of iNOS expression levels together with a significant reduction of UCP-2 levels in the aorta (Figure 5C). Moreover, normoinsulinemic obese BATIRKO mice with lower UCP-2 levels and higher vascular damage showed a significant increase of iNOS levels as compared with moderate hyperinsulinemic BATIRKO mice in the aorta (Figure 5D).

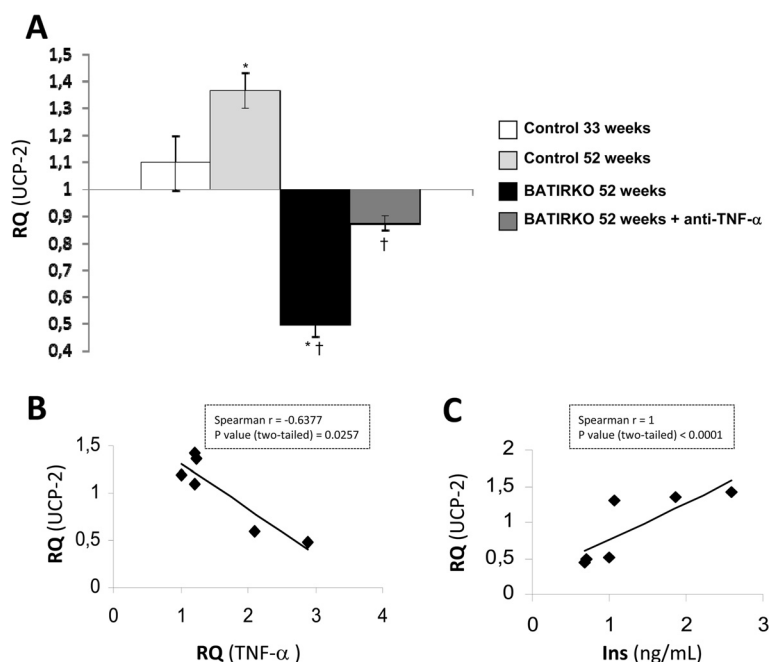


Figure 4 Effect of anti-TNF- α pre-treatment on UCP-2 expression level in BATIRKO mice. **(A)** qRT-PCR analysis of UCP-2 mRNA expression in aorta from Control and BATIRKO mice and anti-TNF- α treated BATIRKO mice at 52 weeks of age. Spearman correlation between UCP-2 expression levels and TNF- α in the aorta **(B)**, or with plasma insulin levels **(C)**. Control 33 weeks (n = 12); Control 52 weeks (n = 12); BATIRKO 52 weeks (n = 8); BATIRKO 52 weeks + anti-TNF- α (n = 3). *p < 0.05 vs. Control; †p < 0.05 vs. 52-wk-old-BATIRKO mice.

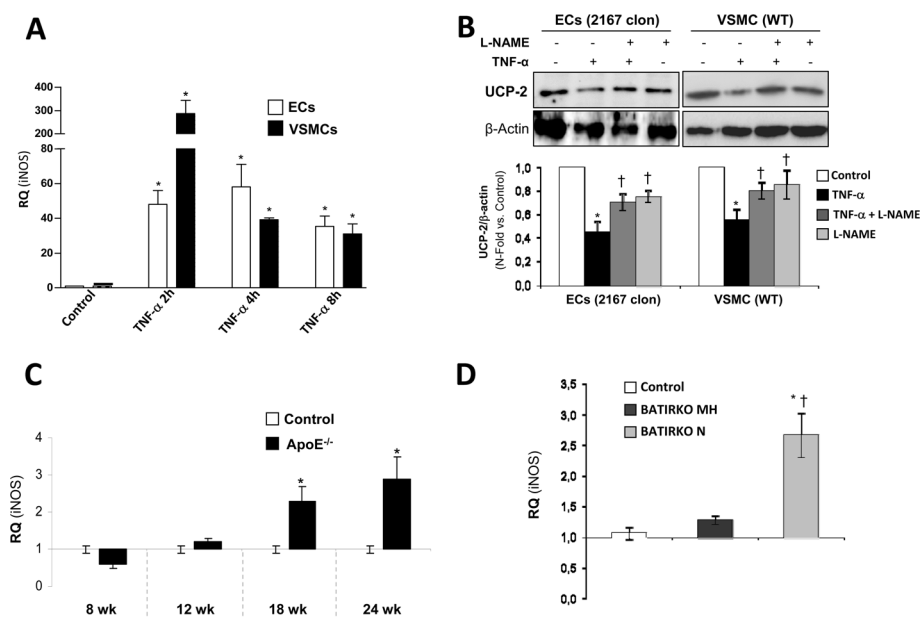


Figure 5 Role of iNOS in the inhibition of UCP-2 expression level induced by TNF- α . **(A)** qRT-PCR analysis of iNOS mRNA expression in ECs and VSMCs stimulated with TNF- α for 2, 4 and 8 hours. **(B)** Western blot analysis of UCP-2 levels with or without iNOS inhibitor (L-NAME) in ECs and VSMCs stimulated with TNF- α . *p < 0.05 vs. control; †p < 0.05 vs. stimuli. qRT-PCR analysis of iNOS mRNA expression in aorta from Control and ApoE^{-/-} mice at 8, 12, 18 and 24 wk of age **(C)** and Control and BATIRKO mice under high-fat diet **(D)**. *p < 0.05 vs. Control; †p < 0.05 vs. BATIRKO MH mice.

Discussion

Protector role of UCP-2 against lipid depot and vascular damage

Atherosclerosis is a multi-factorial chronic vascular inflammatory disease characterized by endothelial dysfunction and accumulation of lipids, inflammatory cells, smooth muscle cells and extracellular matrix in the arterial neointima [28]. Several studies suggest that ROS are involved in plaque formation [29] and all plaque cellular components may respond to and be damaged by ROS, contribute to plaque progression and finally, to plaque rupture [30]. Thus, several approaches to stop ROS production and to alter disease progression have been used [31,32]. In addition, it has been previously published that UCP-2 overexpression in macrophages decreases intracellular ROS levels and reduces their immune activity [33,34]. Moreover, UCP-2 might function as an adaptive antioxidant defense to protect against the development of atherosclerosis in response to high fat and cholesterol diet [35] and improve hyperglycemia-induced endothelial dysfunction [12]. Under this scenario, our results demonstrate that high-fat diet BATIRKO mice showing lower UCP-2 expression levels manifested higher oxidative stress in the aorta. Moreover, the decrease in UCP-2 levels in the aorta is strongly inversely correlated with lipid accumulation and lesion area from 24-week-old ApoE^{-/-} mice or normoinsulinemic BATIRKO mice in the aorta. Previous results have also suggested a protective role of UCP-2 against atherosclerosis [10] showing an antiatherogenic effect in macrophages, ECs and VSMCs [11]. Thus, UCP-2 higher expression reduced proliferation, migration and plasminogen activator 1 expression in human VSMCs [36].

Insulin induces UCP-2 overexpression in aorta protecting against vascular damage

A better knowledge of UCP-2 expression levels regulation in the vasculature may improve the management of the atherosclerotic process. Thus, we explored the association between insulin and UCP-2 *in vivo* and *in vitro*. Our results suggest that insulin or moderate hyperinsulinemia in response to insulin resistance induces UCP-2 expression in ECs and VSMCs or in the aorta from BATIRKO MH mice respectively. On this regard, we previously demonstrated that insulin or IGF-1 induce UCP-1 expression through IRS-1 or AP-1 activity in a PI3K/Akt dependent manner [37,38]. Others authors had also described similar effects of insulin on UCP-2 expression levels in bovine retinal microvascular endothelial cells [39] or in skeletal muscle [40]. Moreover, it has been described that intensive insulin therapy suppressed iNOS gene expression in liver and skeletal muscle, possibly in part via reduced NF-κB activation, and lowered the elevated circulating NO levels [41]. So, insulin might also reduced NF-κB

activation and iNOS levels in aorta and in consequence favours UCP-2 overexpression and protect against vascular damage.

TNF-α downregulates UCP-2 in aorta accelerating vascular damage

Among several proinflammatory and proatherogenic signals working on the vasculature TNF-α is relevant the most. Thus, the relationship between TNF-α and UCP-2 expression levels appears to be of importance in assessing vascular damage risk. On this regard, we have shown that insulin and TNF-α have antagonistic effect on UCP-2 expression in ECs and VSMCs. It has been previously published that proinflammatory cytokines such as TNF-α and/or IL-1β downregulated UCP-2 levels in adipocytes [42], INS-1 cells or rat pancreatic islets [43]. Moreover, our data provide a strong support *in vivo* to the negative relationship between TNF-α and UCP-2. Thus, 52-week-old BATIRKO mice or normoinsulinemic BATIRKO mice under high-fat diet with lower UCP-2 levels showed elevated TNF-α expression levels in WAT, plasma and aorta. Moreover, TNF-α may directly downregulates adiponectin [44] contributing to the development of vascular insulin resistance and the decrease of UCP-2 levels in the aorta. On this regard, it has previously been described that adiponectin induces UCP-2 expression in the liver [45]. In the two populations of BATIRKO mice, we observed a negative correlation between TNF-α and adiponectin levels in both WAT and plasma. Therefore, higher levels of adiponectin might induce UCP-2 overexpression in the aorta attenuating vascular damage. The use of the anti-TNF-α antibody pre-treatment support the concept that TNF-α downregulates UCP-2 expression levels as shown in 52-week-old BATIRKO mice.

Other mechanism involved in the inhibitory effect of TNF-α on UCP-2 expression levels is the NO-dependent pathway induction of iNOS expression in ECs and VSMCs as previously described in 3T3F442A preadipocytes [42]. *In vivo*, we also demonstrated that anti-TNF-α treatment in 52-week-old BATIRKO mice is able to reduce NF-κB activation in white and brown adipose tissues and aorta, reducing iNOS levels in aorta [24] and increasing UCP-2 levels in aorta and as result lowering vascular damage. Moreover, LPS promoted the expression of iNOS and ROS production as well as inflammatory cytokines in UCP-2^{-/-} macrophages [46,47]. Our data strongly suggest an inverse relationship between iNOS and UCP-2. Thus, 24-week-old ApoE^{-/-} mice, normoinsulinemic BATIRKO mice under high-fat diet and 52-week-old BATIRKO mice with lower UCP-2 levels had higher iNOS levels and higher vascular damage. In addition, anti-TNF-α antibody pre-treatment reduced iNOS expression, restoring UCP-2 levels, and improving vascular alterations from 52-week-old BATIRKO mice [24].

Conclusions

In conclusion, our results suggest that insulin and TNF- α share an antagonistic effect on UCP-2 expression levels in vascular cells and also in the aorta *in vivo*. Thus, moderate hyperinsulinemia in response to insulin resistance or lowering of TNF- α levels within the aorta attenuates vascular damage, this protective effect being mediated by UCP-2 expression levels through iNOS.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. UCP-2 protein expression *in vivo*. UCP-2 protein levels were detected by Western blot and α -tubulin was used as loading control. UCP-2 protein levels in aorta artery from Control and ApoE^{-/-} mice at 24 weeks of age (A), Control, moderate hyperinsulinemic obese BATIRKO and normoinsulinemic obese BATIRKO under HFD (B), Control at 33 weeks of age, Control and BATIRKO and 52 weeks of age (C) and anti-TNF- α treated BATIRKO mice at 52 weeks of age (D). (A) Control at 24 weeks of age (C24, n=3); ApoE^{-/-} mice at 24 weeks of age (ApoE^{-/-}24, n=3); *p<0.05 vs. C24. (B) Control under HFD (C; n=3); moderate hyperinsulinemic obese BATIRKO mice (BMH, n=3); normoinsulinemic obese BATIRKO mice (BN, n=3). †p<0.05 vs. BMH mice. (C and D) Control 33 weeks (C33, n=3); Control 52 weeks (C52, n=6); BATIRKO 52 weeks (B52w, n=5); BATIRKO 52 weeks + anti-TNF- α (B52+anti-TNF- α , n=3). †p<0.05 vs. C52; #p<0.05 vs. B52.

Additional file 2: Figure S2. Characterization of vascular damage in BATIRKO mice under high-fat diet. (A) Vascular function was studied in aortic rings from control and BATIRKO mice under HFD. We evaluated endothelium-dependent relaxations to acetylcholine (ACh; 10⁻⁵ mol/L) and endothelium-independent relaxations induced by sodium nitroprusside (SNP; 10⁻⁷ mol/L) in phenylephrine (10⁻⁶ mol/L) precontracted rings. (B) Contractile responses to thromboxane A2 analogue (U46619; 10⁻⁶ mol/L) and Angiotensin II (Ang II, 10⁻⁶ mol/L) in aortic rings from controls and BATIRKO mice. (C) (Left) Representative photomicrographs of macrophages immunohistochemistry (F4/80) (first file of panels), of nitrotyrosine levels by immunohistochemistry (IHC) (second file of panels) and of superoxide anion levels *in situ* by hydroethidine method (third file of panels) in aortic roots from control and BATIRKO mice. (Right) Quantitative analysis of lesion area, macrophage infiltration, superoxide levels and of nitrotyrosine expression in aortic roots from control and BATIRKO mice. Results are expressed as mean \pm SEM. Control (n=12), BATIRKO MH (n=6), BATIRKO N (n=10). *p<0.05 vs. Control; †p<0.05 vs. BATIRKO MH mice.

Abbreviations

ACh: Acetylcholine; Ang II: Angiotensin II; Akt: Protein kinase B (Pkb); ApoE^{-/-} mice: Apolipoprotein E knockout mice; BAT: Brown adipose tissue; BATIRKO: BAT-specific IR knockout mice; BATIRKO MH: Moderate hyperinsulinemic obese BATIRKO mice; BATIRKO N: Normoinsulinemic obese BATIRKO mice; ECs: Endothelial cell lines; L-NAME: Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride- NOS inhibitor; HFD: High-fat diet; IGF-1: Insulin-like growth factor-1; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; IR: Insulin receptor; NF- κ B: Nuclear factor kappa B; ROS: Reactive oxygen species; SNP: Sodium nitroprusside; STD: Standard diet; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; TXA2: Thromboxane A2; UCP-2: Uncoupling protein 2; U46619: TXA2 analogue; VSMCs: Vascular smooth muscle cells; WAT: White adipose tissue; wk: week.

Competing interests

The authors have nothing to disclose.

Authors' contributions

AG-H: has participated to the acquisition of data *in vitro* e *in vivo*, analysis and interpretation of data and in the design of study and its coordination and in the statistical analysis as well as writing the paper. LP, NB, OE, YFO, CG and SD-C: have participated to the acquisition of data *in vitro* e *in vivo*, analysis and interpretation of data. NH, VC and VL: have participated in the analysis of vascular function from experimental models and helped to draft

the manuscript. BG-L: has participated to the acquisition of data *in vitro*. MB: has participated in the design of the study and its coordination and writing the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Gema García-Gómez and Silvia Fernández for technical assistance. This work was supported by grants SAF2008/00031 and SAF2011/22555 from MCINN, Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423) and CIBERDEM ISCIII, Spain.

Author details

¹Biochemistry and Molecular Biology Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain. ²CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Madrid, Spain. ³Almudena Gómez-Hernández, Biochemistry and Molecular Biology Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid 28040, Spain. ⁴Physiology Department, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

Received: 23 April 2014 Accepted: 27 June 2014

Published: 31 July 2014

References

1. Diano S, Horvath TL: **Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism.** *Trends Mol Med* 2012, **18**:52–58.
2. Dalgaard LT, Pedersen O: **Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes.** *Diabetologia* 2001, **44**:946–965.
3. Klingenberg M, Huang SG: **Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1415**:271–296.
4. Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA: **Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis.** *Diabetes* 1997, **46**:900–906.
5. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP: **Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression.** *FEBS Lett* 1997, **408**:39–42.
6. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH: **Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia.** *Nat Genet* 1997, **15**:269–272.
7. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D: **Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production.** *Nat Genet* 2000, **26**:435–439.
8. Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB: **Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice.** *J Biol Chem* 2000, **275**:16258–16266.
9. Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman ML: **Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3.** *J Biol Chem* 2000, **275**:16251–16257.
10. Blanc J, Alves-Guerra MC, Esposito B, Rousset S, Gourdy P, Ricquier D, Tedgui A, Miroux B, Mallat Z: **Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis.** *Circulation* 2003, **107**:388–390.
11. Kim HS, Park KG, Koo TB, Huh S, Lee IK: **The modulating effects of the overexpression of uncoupling protein 2 on the formation of reactive oxygen species in vascular cells.** *Diabetes Res Clin Pract* 2007, **77**:S46–S48.
12. Sun J, Pu Y, Wang P, Chen S, Zhao Y, Liu C, Shang Q, Zhu Z, Liu D: **TRPV1-mediated UCP2 upregulation ameliorates hyperglycemia-induced endothelial dysfunction.** *Cardiovasc Diabetol* 2013, **12**:69.
13. Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, Laville M, Langin D: **Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans.** *J Clin Invest* 1997, **100**:2665–2670.
14. Bao S, Kennedy A, Wojciechowski B, Wallace P, Ganaway E, Garvey WT: **Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes.** *Diabetes* 1998, **47**:1935–1940.

15. Oktavianthi S, Trimarsanto H, Febinia CA, Suastika K, Saraswati MR, Dwipayana P, Arindrarto W, Sudoyo H, Malik SG: **Uncoupling protein 2 gene polymorphisms are associated with obesity.** *Cardiovasc Diabetol* 2012, **11**:41.
16. Wang H, Chu WS, Lu T, Hasstedt SJ, Kern PA, Elbein SC: **Uncoupling protein-2 polymorphisms in type 2 diabetes, obesity, and insulin secretion.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **286**:E1–E7.
17. Shen H, Qi L, Tai ES, Chew SK, Tan CE, Ordovas JM: **Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A, central adiposity, and metabolic syndrome in Asians.** *Obesity* 2006, **14**:656–661.
18. D'Adamo M, Perego L, Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, Andreozzi F, Sciacqua A, Lauro D, Sbraccia P, Federici M, Paganelli M, Pontiroli AE, Lauro R, Perticone F, Folli F, Sesti G: **The -866A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes.** *Diabetes* 2004, **53**:1905–1910.
19. Badimon L, Hernández Vera R, Vilahur G: **Atherothrombotic risk in obesity.** *Hamostaseologie* 2013, **33**:259–268.
20. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M: **Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction.** *N Engl J Med* 1998, **339**:229–234.
21. Goyal R, Faizy AF, Siddiqui SS, Singhai M: **Evaluation of TNF- α and IL-6 Levels in Obese and Non-obese Diabetics: Pre- and Postinsulin Effects.** *N Am J Med Sci* 2012, **4**:180–184.
22. Gómez-Hernández A, Escribano Ó, Perdomo L, Otero YF, García-Gómez G, Fernández S, Beneit N, Benito M: **Implication of insulin receptor A isoform and IRA/IGF-IR hybrid receptors in the aortic vascular smooth muscle cell proliferation: role of TNF- α and IGF-II.** *Endocrinology* 2013, **154**:2352–2364.
23. Gómez-Hernández A, Otero YF, de las Heras N, Escribano O, Cachafeiro V, Lahera V, Benito M: **Brown fat lipotrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction.** *Endocrinology* 2012, **153**:1242–1255.
24. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG: **Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research.** *PLoS Biol* 2010, **8**:e1000412.
25. Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M: **Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform.** *Diabetes* 2009, **58**:820–828.
26. Yonezawa T, Sanosaka M, Haga S, Kobayashi Y, Katoh K, Obara Y: **Regulation of uncoupling protein 2 expression by long-chain fatty acids and hormones in bovine mammary epithelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **375**:280–285.
27. Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Brüning J, Kozak LP, Kahn CR, Benito M: **Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance.** *J Clin Invest* 2001, **108**:1205–1213.
28. Ross R: **The pathogenesis of atherosclerosis—an update.** *N Engl J Med* 1986, **314**:488–500.
29. Chisolm GM, Steinberg D: **The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview.** *Free Radic Biol Med* 2000, **28**:1815–1826.
30. Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, Lesèche G, Tedgui A, Maclouf J, Murphy RC: **The relationship of hydroxyecosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis.** *J Clin Invest* 1999, **103**:421–427.
31. Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, Runge MS: **p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice.** *J Clin Invest* 2001, **108**:1513–1522.
32. Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, Lusis AJ: **Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice.** *Circ Res* 2002, **91**:120–126.
33. Kizaki T, Suzuki K, Hitomi Y, Taniguchi N, Saitoh D, Watanabe K, Onoé K, Day NK, Good RA, Ohno H: **Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:9392–9397.
34. Ryu JW, Hong KH, Maeng JH, Kim JB, Ko J, Park JY, Lee KU, Hong MK, Park SW, Kim YH, Han KH: **Overexpression of uncoupling protein 2 in THP1 monocytes inhibits beta2 integrin-mediated firm adhesion and transendothelial migration.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, **24**:864–870.
35. Moukdar F, Robidoux J, Lyght O, Pi J, Daniel KW, Collins S: **Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice.** *J Lipid Res* 2009, **50**:59–70.
36. Park JY, Park KG, Kim HJ, Kang HG, Ahn JD, Kim HS, Kim YM, Son SM, Kim IJ, Kim YK, Kim CD, Lee KU, Lee IK: **The effects of the overexpression of recombinant uncoupling protein 2 on proliferation, migration and plasminogen activator inhibitor 1 expression in human vascular smooth muscle cells.** *Diabetologia* 2005, **48**:1022–1028.
37. Valverde AM, Arribas M, Mur C, Navarro P, Pons S, Cassard-Doulcier AM, Kahn CR, Benito M: **Insulin-induced up-regulated uncoupling protein-1 expression is mediated by insulin receptor substrate 1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in fetal brown adipocytes.** *J Biol Chem* 2003, **278**:10221–10231.
38. Teruel T, Valverde AM, Navarro P, Benito M, Lorenzo M: **Inhibition of PI 3-kinase and RAS blocks IGF-I and insulin-induced uncoupling protein 1 gene expression in brown adipocytes.** *J Cell Physiol* 1998, **176**:99–109.
39. Wu H, Jiang C, Gan D, Liao Y, Ren H, Sun Z, Zhang M, Xu G: **Different effects of low- and high-dose insulin on ROS production and VEGF expression in bovine retinal microvascular endothelial cells in the presence of high glucose.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011, **249**:1303–1310.
40. Pedersen SB, Lund S, Buhl ES, Richelsen B: **Insulin and contraction directly stimulate UCP2 and UCP3 mRNA expression in rat skeletal muscle in vitro.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **283**:19–25.
41. Langouche L, Vanhorebeek I, Vlasselaers D, Vander Perre S, Wouters PJ, Skogstrand K, Hansen TK, Van den Berghe G: **Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients.** *J Clin Invest* 2005, **115**:2277–2286.
42. Merial C, Bouloumie A, Trocheris V, Lafontan M, Galitzky J: **Nitric oxide-dependent downregulation of adipocyte UCP-2 expression by tumor necrosis factor- α .** *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, **279**:C1100–C1106.
43. Li LX, Yoshikawa H, Egeberg KW, Grill V: **Interleukin-1 β swiftly down-regulates UCP-2 mRNA in beta-cells by mechanisms not directly coupled to toxicity.** *Cytokine* 2003, **23**:101–107.
44. Li L, Yang G, Shi S, Yang M, Liu H, Boden G: **The adipose triglyceride lipase, adiponectin and visfatin are downregulated by tumor necrosis factor- α (TNF- α) in vivo.** *Cytokine* 2009, **45**:12–19.
45. Zhou M, Xu A, Tam PK, Lam KS, Huang B, Liang Y, Lee IK, Wu D, Wang Y: **Upregulation of UCP2 by adiponectin: the involvement of mitochondrial superoxide and hnRNP K.** *PLoS One* 2012, **7**:e32349.
46. Bai Y, Onuma H, Bai X, Medvedev AV, Misukonis M, Weinberg JB, Cao W, Robidoux J, Floering LM, Daniel KW, Collins S: **Persistent nuclear factor- κ B activation in Ucp2-/- mice leads to enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine production.** *J Neurochem* 2004, **89**:1283–1292.
47. Emre Y, Hurtaud C, Nübel T, Criscuolo F, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM: **Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages.** *Biochem J* 2007, **402**:271–278.

doi:10.1186/s12933-014-0108-9

Cite this article as: Gómez-Hernández et al.: Antagonistic effect of TNF- α and insulin on uncoupling protein 2 (UCP-2) expression and vascular damage. *Cardiovascular Diabetology* 2014 **13**:108.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Implication of Insulin Receptor A Isoform and IRA/IGF-IR Hybrid Receptors in the Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation: Role of TNF- α and IGF-II

Almudena Gómez-Hernández, Óscar Escribano, Liliana Perdomo, Yolanda F. Otero, Gema García-Gómez, Silvia Fernández, Nuria Beneit, and Manuel Benito

Biochemistry and Molecular Biology Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Instituto de Investigaciones Sanitarias Hospital Clínico San Carlos, Centro de Investigación Biomédica en Red of Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Madrid 28040, Spain

To assess the role of insulin receptor (IR) isoforms (IRA and IRB) in the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) involved in the atherosclerotic process, we generated new VSMC lines bearing IR (wild-type VSMCs; IRLoxP^{+/+} VSMCs), lacking IR (IR^{-/-} VSMCs) or expressing IRA (IRA VSMCs) or IRB (IRB VSMCs). Insulin and different proatherogenic stimuli induced a significant increase of IRA expression in IRLoxP^{+/+} VSMCs. Moreover, insulin, through ERK signaling, and the proatherogenic stimuli, through ERK and p38 signaling, induced a higher proliferation in IRA than IRB VSMCs. The latter effect might be due to IRA cells showing a higher expression of angiotensin II, endothelin 1, and thromboxane 2 receptors and basal association between IRA and these receptors. Furthermore, TNF- α induced in a ligand-dependent manner a higher association between IRA and TNF- α receptor 1 (TNF-R1). On the other hand, IRA overexpression might favor the atherogenic actions of IGF-II. Thereby, IGF-II or TNF- α induced IRA and IGF-I receptor (IGF-IR) overexpression as well as an increase of IRA/IGF-IR hybrid receptors in VSMCs. More importantly, we observed a significant increase of IRA, TNF-R1, and IGF-IR expression as well as higher association of IRA with TNF-R1 or IGF-IR in the aorta from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice, 2 models showing vascular damage. In addition, anti-TNF- α treatment prevented those effects in BATIRKO mice. Finally, our data suggest that the IRA isoform and its association with TNF-R1 or IGF-IR confers proliferative advantage to VSMCs, mainly in response to TNF- α or IGF-II, which might be of significance in the early atherosclerotic process. (*Endocrinology* 154: 2352–2364, 2013)

Insulin exhibits a number of actions depending on the stage of development and/or differentiation and the cell type studied. Selectivity in insulin signaling is currently discussed because of activation of specific signal transduction pathways (1). The cascade begins when the activated insulin receptor (IR) β -chain phosphorylates IR substrate (IRS) proteins and then activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway, which plays a cen-

tral role in both the survival and metabolic actions elicited by insulin (2). Thus, insulin exerts its action through its receptor. Alternative splicing of the 36-nucleotide exon 11 of the IR α -subunits results in the expression of 2 isoforms: IRA (lacking exon 11) and IRB (including exon 11) (3). The relative abundance of the mRNAs encoding IRA and IRB displays tissue specificity in different species (4, 5). Moreover, IR isoform expression is regulated by stage of

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2013 by The Endocrine Society

Received November 23, 2012. Accepted May 1, 2013.

First Published Online May 15, 2013

Abbreviations: Ang II, angiotensin II; AT-1, angiotensin receptor 1; BrdU, bromodeoxyuridine; ET-1, endothelin-1; ET-A, endothelin receptor A; ICAM-1, intercellular adhesion molecular-1; IGF-IR, IGF-I receptor; IR, insulin receptor; IRS, IR substrate; Glut-4, glucose transporter type 4; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; qRT-PCR, quantitative real-time PCR; α -SMA, α -smooth muscle actin; TNF-R1, TNF- α receptor 1; TP, TXA₂ receptor; TXA₂, thromboxane A₂; VSMC, vascular smooth muscle cell; WT, wild-type.

development and by cell differentiation. IRA is predominantly expressed in fetal and cancer cells, whereas IRB is mainly expressed in differentiated insulin target cells (6, 7).

The 2 IR isoforms have been reported to exhibit distinct functional properties. Although IRA and IRB show a high specificity for insulin, IRA exhibits a much higher internalization rate than IRB (8), intermediate affinity for IGF-II, and low affinity for IGF-I (6). In mouse β -cell lines, IRA conferred a proliferative capacity in response to insulin or IGF-I, providing a potential explanation for the β -cell hyperplasia induced by liver insulin resistance in iLIRKO mice, especially that IRA is upregulated in pancreatic islets in this model (9). In 32D cells, a murine hematopoietic cell line, IRA induces mitogenic and antiapoptotic signals in response to IGF-II (10). Furthermore, in a hepatoma cell line, a switch from IRA to IRB induced by dexamethasone is correlated with increased insulin sensitivity (11). Finally, an alteration of IRA/IRB balance might serve as a ligand-independent apoptotic trigger in hepatocytes, regulating liver development (12).

On the other hand, the potential role of both IR isoforms in the early atherosclerosis is completely unknown. To assess the role of IR isoforms (IRA and IRB) in the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) involved at the early stages of the atherosclerotic process, we have generated new murine aortic VSMC lines with IR (wild-type [WT] VSMCs and IRLoxP^{+/+} VSMCs), lacking IR expression (IR^{-/-} VSMCs), expressing IRA isoform (IRA VSMCs), or expressing IRB isoform (IRB VSMCs). In these cell lines, we have studied their rates of proliferation induced by different atherogenic stimuli (such as TNF- α) as well as the association between IR isoforms and other atherogenic receptors (such as high-affinity TNF- α receptor 1 [TNF-R1]) or with IGF-I receptor (IGF-IR). In addition, we studied the expression of IR isoforms in 2 models of vascular damage: a classical model of atherosclerosis (ApoE^{-/-} mice under a Western diet for 18 weeks) and a second model of vascular insulin resistance and dysfunction (BATIRKO mice) (13). Our results strongly suggest that the IRA isoform, but not IRB isoform, confers proliferative advantage to the aortic VSMCs in response to several proatherogenic stimuli. Additionally, IRA isoform might associate with IGF-IR favoring atherogenic actions of IGF-II under inflammatory conditions, with TNF- α playing a major role.

Materials and Methods

Animals

Male mice were maintained in the Animal Care Facility under the standard conditions of temperature and a 12-hour light, 12-

hour dark cycle. ApoE^{-/-} and WT mice were housed in individual cages. The animals were fed a Western-type diet (A04 plus 21% kilocalories from fat) for 18 weeks starting on the sixth week. Mice were genotyped by PCR. Tail DNA (100–200 ng) was amplified 35 cycles (30 seconds at 94°C, 40 seconds at 68°C, and 1 minute at 72°C) on a thermal cycler. Three primers were used: a forward primer, oIMR0180 (5'-GCCTAGC-CGAGGGAGAGCCG-3'), and 2 reverse primers, oIMR0181 (5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3') and oIMR0182 (5'-GCCGCCCGACTGCATCT-3'). A 155-bp band was obtained for WT mice and a 245-bp band for ApoE^{-/-} mice. The other mouse model used was BATIRKO mice. The control group is formed by IRloxP/loxP and WT C57BL/6 mice. IRloxP/loxP mice under a C57BL/6 genetic background were created by homologous recombination using an IR gene-targeting vector with loxP sites flanking exon 4 as described (14). BATIRKO mice were obtained on the background of IRloxP/loxP mice for 14 generations to assure a unique genetic background. Male mice fed a standard diet (3% calories from fat, A04) for 52 weeks. Moreover, 1 group of 52-week-old BATIRKO mice were treated with Low Endotoxin, Azide-Free (LEAF) purified antimouse TNF- α (MP6-XT22; BioLegend, San Diego, California) (50 μ g/mouse ip) every 3 days for 6 weeks. Genotyping of the IRloxP/loxP and UCP-1-Cre transgenic mice were performed by PCR as previously described (13).

Anesthetized mice (Avertin, 250 mg/kg, ip) were saline-perfused. The aortic root was embedded in OCT and frozen for immunohistochemistry, and the thoracic aorta was frozen to analyze the mRNA expression of genes involved in the atherosclerosis process by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The study was performed in accordance with the European Union normative and was approved by the ethical committee of our institution. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996).

Analytical procedures

Insulin plasma levels were analyzed using ELISA kits (Millipore, Billerica, Massachusetts). Cholesterol and triglycerides were tested in plasma samples from fasted mice (Spinreact, Barcelona, Spain). Blood glucose level was determined in fasted animals using a glucometer (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

Histological analysis

Aortic roots were OCT-embedded, and sections of 7 μ m were Oil-Red-O/hematoxylin stained to measure lipid depot. The lesion size on the aortic root was also measured as described (15) and expressed as area lesion/aorta area.

Macrophages, α -SMC and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) levels were detected by immunoperoxidase with rat antimouse F4/80 antigen (MCA497GA, AbD Serotec, Oxford, United Kingdom), mouse anti- α -SMC monoclonal and rabbit anti-PCNA polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, California), respectively, as previously described (13).

Immunohistochemistry against α -smooth muscle actin (α -SMA) followed by immunofluorescence against PCNA in the same slide was performed to localize the SMCs that were proliferating in aortic root from control and ApoE^{-/-} mice.

Cell cultures

Primary VSMCs were obtained from thoracic aorta arteries of 3 male 8-week-old WT and IRLoxP^{+/+} mice. Anesthetized mice (Avertin, 250 mg/kg, ip) were saline-perfused, and thoracic aorta arteries were submitted to collagenase dispersion and primary culture as previously described (16). The obtaining of new murine aortic VSMCs with IR (WT VSMCs and IRLoxP^{+/+} VSMCs) and without IR (IR^{-/-} VSMCs) and the cell lines specifically expressing IRA isoform (IRA VSMCs) or IRB isoform (IRB VSMCs) was performed as described (12) (Supplemental Data, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>). Thus, primary culture of IRLoxP^{+/+} VSMCs were transfected by retroviral infection (virus particles contain pBabe retroviral vector encoding of SV40 large T antigen) and selected with 1 µg/mL puromycin for 3 weeks. Immortalized IRLoxP^{+/+} VSMCs were infected with adenoviruses encoding Cre recombinase to obtain IR^{-/-} VSMCs. Finally, IR^{-/-} VSMCs were transfected by retroviral infection (virus particles contain pBabe retroviral vector encoding the individual spliced isoforms of the human IR, IRA, or IRB) and selected with 200 µg/mL hygromycin for 2 weeks to obtain IRA or IRB VSMCs, respectively.

Five cell lines were cultured with 10% fetal bovine serum-DMEM and were serum-starved for 4 to 5 hours for the insulin signaling and proliferation studies or 18 hours for studies of mRNA expression and then incubated with the corresponding stimulus. For in vitro experiments, we have used insulin (10 or 100 nmol/L), IGFs (10 and 25 nmol/L; Millipore), TNF-α (10 ng/mL; Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri), angiotensin II (1 µmol/L; Sigma), endothelin 1 (0.1 nmol/L; Sigma), and U46619 (thromboxane A2 [TXA₂] analog, 1 µmol/L). Cells were cultured to subconfluence (70%–80%) in the insulin signaling, glucose uptake, and mRNA expression experiments.

Measurement of glucose uptake in VSMCs

Cells were cultured to 80% confluence in 10% fetal bovine serum-DMEM and serum and glucose deprived for 4 to 6 hours. Then, insulin was added to the wells for 30 minutes. Glucose uptake was measured by incubating cells with 2-deoxy-D-[1-³H]glucose for the last 10 minutes in triplicate dishes from 6 independent experiments as previously described (9).

RNA extraction and qRT-PCR

Total RNA was extracted from aorta arteries and VSMCs by the TRIzol method (Invitrogen, Barcelona, Spain) and quantified by absorbance at 260 nm. Twenty nanograms of RNA were necessary to perform the reverse transcription reaction with the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, California). We evaluated the mRNA expression of genes involved in vascular dysfunction (endothelin-1 [ET-1] and intercellular adhesion molecular-1 [ICAM-1]) and inflammation (MCP-1, TNF-α, and plasminogen activator inhibitor-1 [PAI-1]) on aorta artery, as well as the mRNA expression of IRA, IRB, and IGF-IR on aorta and VSMCs. Amplification of *GADPH* was used in the same reaction of all samples as an internal control. qRT-PCR was performed in a 7500 Real-Time PCR device, and the relative quantification was performed with the Prism 7000 system SDS software (Applied Biosystems). The expression of these genes was analyzed by qRT-PCR as described (9).

Western blot analysis

Western blot analyses were performed on protein extracts from VSMCs as previously described (9). The antibodies used were anti-IRβ (Ab-4) from Oncogene (Dublin, Ohio); phospho-AKT (Ser473), AKT, p-p706K (Ser389), p70, pERK1/2 (S202/T204), and ERK from Cell Signaling; glucose transporter type 4 (Glut-4), TNF-R1, TNF-R2, angiotensin receptor 1 (AT-1), and endothelin receptor A (ET-A) from Santa Cruz Biotechnology; p53 from Millipore; TXA₂ receptor (TP) from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan); and α- and β-actin and α-tubulin antibodies from Sigma-Aldrich Corp (St Louis, Missouri). The anti-IRB antibody (plus exon 11) was kindly provided by Dr Sesti and Dr Hribal.

Immunoprecipitation

To obtain total cell lysates, cells from supernatants were collected by centrifugation at 2000g for 5 minutes at 4°C. Samples of cell lysates or homogenates of aorta artery were sonicated 30 seconds at 1.5 mA, and lysates were clarified by centrifugation at 12 000g for 10 minutes. For immunoprecipitation, 150 to 200 µg protein was immunoprecipitated at 4°C with the corresponding antibodies and isotype control serum. The immune complexes were collected on protein A-agarose or protein G-agarose beads and submitted to SDS-PAGE.

For immunoprecipitation with protein extracts from the aortic samples, we had to use aortic pools from 5 ApoE^{-/-} mice and their corresponding control mice. However, we used individual aortas from 3 mice per group in BATIRKO mice and their control mice. A total of 150 µg protein was immunoprecipitated with IRB isoform antibody. The supernatants were reimmunoprecipitated with IRB isoform antibody. The supernatants from the second immunoprecipitation were immunoprecipitated with IRβ antibody (recognizes 2 IR isoforms). Thus, immune complexes (only IRA) were collected on protein A-agarose beads and submitted to SDS-PAGE. Finally, the immunoblots were incubated with anti-TNF-R1 or anti-IGF-IR antibodies to study the association between IRA isoform and TNF-R1 or IGF-IR, respectively.

Isolation of plasma membranes

VSMCs were resuspended with homogenization buffer and incubated for 10 minutes at 4°C. The suspensions were homogenized with a glass Dounce homogenizer. The homogenate underwent centrifugation at 1300 rpm for 10 minutes, and the supernatant was saved as the nucleic fraction. Then, the pellet was homogenized and centrifuged and the supernatant was collected to obtain the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in homogenization buffer plus 1% Triton X-100 and incubated for 60 minutes at 4°C. Finally, the homogenate was centrifuged at 14 000 rpm for 30 minutes and supernatant was saved as the membrane fraction. In the cytosolic and plasma membrane fractions, we detected Glut-4 by Western blot using anti-Glut-4 antibody (Millipore). Anti-Na⁺/K⁺ ATPase (Santa Cruz Biotechnology) and anti-glycogen synthase kinase 3 beta (Cell Signaling) antibodies were used as charge control in plasma membrane and cytosol fractions, respectively.

Proliferation studies

A total of 10⁴ cells in 1 mL complete medium were seeded into each well of an uncoated 96-well plate. The next day, the cells

were serum deprived for 5 hours and stimulated with insulin, proatherogenic molecules, IGF-I, or IGF-II for 24 hours. After that, the rate of cellular proliferation was evaluated using a cell proliferation ELISA bromodeoxyuridine (BrdU) kit (Roche Applied Science, Barcelona, Spain) or by cell counting (CASY cell counter). The incubation with BrdU labeling solution was for 18 hours.

ELISA of IGF-II

The quantitative determination of mouse IGF-II concentrations in cell culture supernatants was performed by the IGF-II ELISA kit (antibodies-online.com).

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using 1-way ANOVA, followed by a Bonferroni test if differences were noted (SPSS version 15.0 program). Spearman's correlation coefficient analysis was used to assess associations between mRNA expression of *ET-1*, *ICAM-1*, *MCP-1*, *TNF- α* , and *PAI-1* with IRA isoform mRNA expression on aorta artery from

ApoE^{-/-} and BATIRKO mice. The null hypothesis was rejected when the *P* value was $<.05$.

Results

Differential insulin signaling by IRA or IRB isoform in aortic VSMCs

To study the role of IR isoforms in the proliferation of VSMCs, we generated new aortic VSMC lines: bearing IR (WT and IRLoxP^{+/+}), lacking IR (IR^{-/-}), and expressing IRA isoform (IRA) or IRB isoform (IRB). First, we performed primary cell culture of WT and IRLoxP^{+/+} VSMCs from thoracic aorta arteries. The primary cell culture was immortalized as assessed by antigen T and p53 Western blot analysis (Figure 1A). Also, a specific marker of SMCs, α -SMA, was further characterized (Figure 1A). Western blot analysis revealed the expression of IR β in

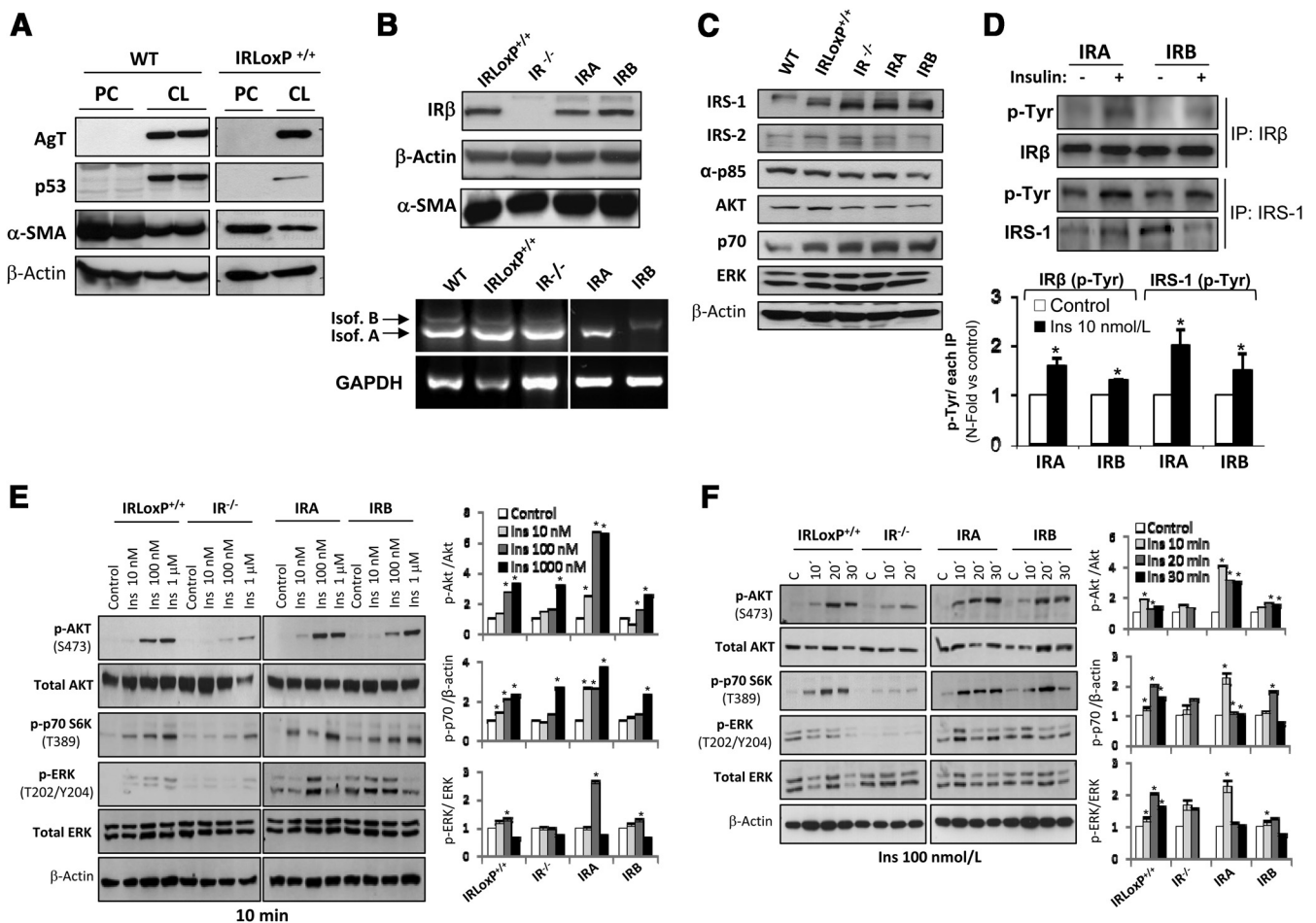


Figure 1. Characterization and insulin signaling of aortic VSMCs. A, Western blot analysis of AgT, p53, α -SMA, and β -actin in aortic VSMC primary culture and cell lines: WT and IRLoxP^{+/+}. B, Western blot analysis of IR β in IRLoxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA, and IRB VSMC lines (upper panel) and RT-PCR of IR isoforms in all cell lines studied (lower panel). C, Western blot analysis of transduction proteins involved in insulin signaling pathway. D, Western blot analysis with anti-IR β , or anti-IRS-1, or anti-phosphotyrosine antibodies in anti-IR β or anti-IRS-1 immunoprecipitates from IRA and IRB VSMCs. E, Insulin dose response for 10 minutes of AKT, p70S6K, and ERK phosphorylation in VSMCs performed by Western blot. F, Time course of AKT, p70S6K, and ERK phosphorylation in VSMCs in response to 100nM insulin. β -Actin was used as a loading control. Experiments were performed at least 5 times. *, *P* $<.05$ vs control. Abbreviations: CL, cell lines; IP, immunoprecipitation; WB, Western blot.

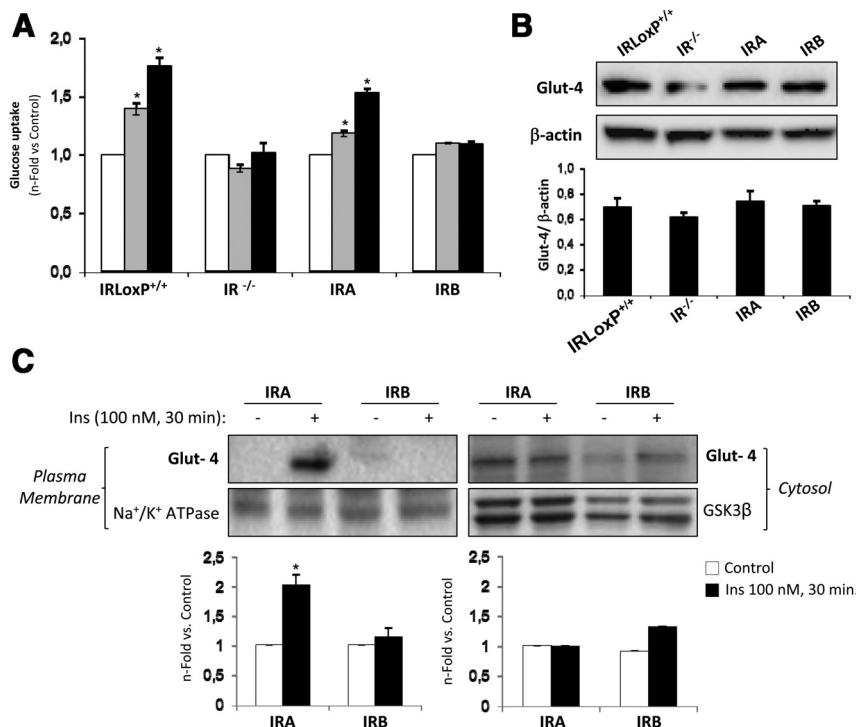


Figure 2. Glucose uptake and Glut-4 translocation in aortic VSMCs. A, Insulin dose response of glucose uptake in VSMC lines. B, Western blot analysis of Glut-4 levels in VSMC lines. C, Western blot analysis of Glut-4 in the plasma membrane and cytosol from VSMCs stimulated with 100nM insulin for 30 minutes. Na⁺/K⁺ ATPase and glycogen synthase kinase 3 beta were used as a loading control in plasma membrane and cytosolic extracts, respectively. Experiments were performed at least 3 times. *, $P < .05$ vs control.

WT cells, the lack of expression in IR^{-/-} VSMCs, and an equal level of expression in IRA VSMCs, IRB VSMCs, and IRLoxP^{+/+} VSMCs (Figure 1A). More importantly, we confirmed by RT-PCR that IRA VSMCs and IRB VSMCs expressed specifically only IRA or IRB isoform, respectively (Figure 1B). All cell lines studied showed similar levels of α -SMA (Figure 1, A and B) and insulin transduction proteins such as IRS-1, IRS-2, α -p85, AKT, p70, and ERK (Figure 1C).

To assess IR functionality in reconstituted cell lines, those cell lines were stimulated with 10nM insulin for 5 minutes and analyzed for Tyr phosphorylation of IR. IRA and IRB VSMCs induced IR tyrosine phosphorylation upon insulin stimulation (Figure 1D). A step further, we also observed a significant increase of Tyr phosphorylation of IRS-1 induced by 10 nmol/L insulin in IRA and IRB cell lines (Figure 1D).

To analyze AKT, p70, and ERK phosphorylation, cells established in culture were stimulated with insulin for 10 minutes in a dose-dependent manner (10nM–1000nM). As expected, the lack of IR totally abolished insulin-stimulated activation of AKT, p70, and ERK in IR^{-/-} VSMCs at insulin physiological concentrations (Figure 1, E and F). However, we observed phosphorylation of those proteins at supraphysiological concentrations of insulin (Figure

1E). In addition, phosphorylation of AKT, p70, and ERKs was studied in IRLoxP^{+/+}, IRA, and IRB VSMCs upon insulin stimulation in a dose- and time-dependent manner. More importantly, higher affinity and maximal phosphorylation of AKT, p70, and ERKs in response to insulin was observed in IRA VSMCs versus IRB VSMCs (Figure 1, E and 1F).

Differential glucose uptake by IRA or IRB isoform in aortic VSMCs

The role of IR isoforms in glucose uptake was also investigated. Insulin induced glucose uptake in IRLoxP^{+/+} VSMCs and IRA VSMCs in a dose-dependent manner (Figure 2A). Conversely, no insulin-induced glucose uptake was found in IRB VSMCs and IR^{-/-} VSMCs. However, Glut-4 protein expression was similar in all cell lines studied (Figure 2B). A step further, insulin induced Glut-4 translocation from cytosol to plasma membrane in IRA VSMCs but not in IRB VSMCs (Figure 2C).

Differential proliferation rate in response to proatherogenic stimuli by IRA or IRB isoform in aortic VSMCs

Proliferation and migration of VSMCs contribute to the development of the atherosclerotic process, and we wondered whether IRA or IRB isoform conferred a proliferative advantage to VSMCs. In this way, insulin and proatherogenic stimuli induced a switch in IRA/IRB ratio, increasing the IRA isoform at the mRNA and protein level without changes in the IRB isoform (Figure 3A and Supplemental Figure 1, A and B). Moreover, the increase observed in total IR protein was mainly owing to an increase in IRA (Supplemental Figure 1, B and C). In addition, we analyzed the proliferation rate at 24 hours as measured by BrdU incorporation or cell counting. Insulin (10–100 nmol/L) induced a discrete proliferation in WT, IRLoxP^{+/+}, and IRB VSMCs. No effect of insulin was observed in IR^{-/-} VSMCs. In contrast, insulin induced a significant increase of proliferation in IRA VSMCs in dose-dependent manner (Figure 3B and Supplemental Figure 2A). Moreover, the ERK-MAPK inhibitor U0126 significantly diminished the cellular proliferation of IRA VSMCs, no effect was observed by the pretreatment with

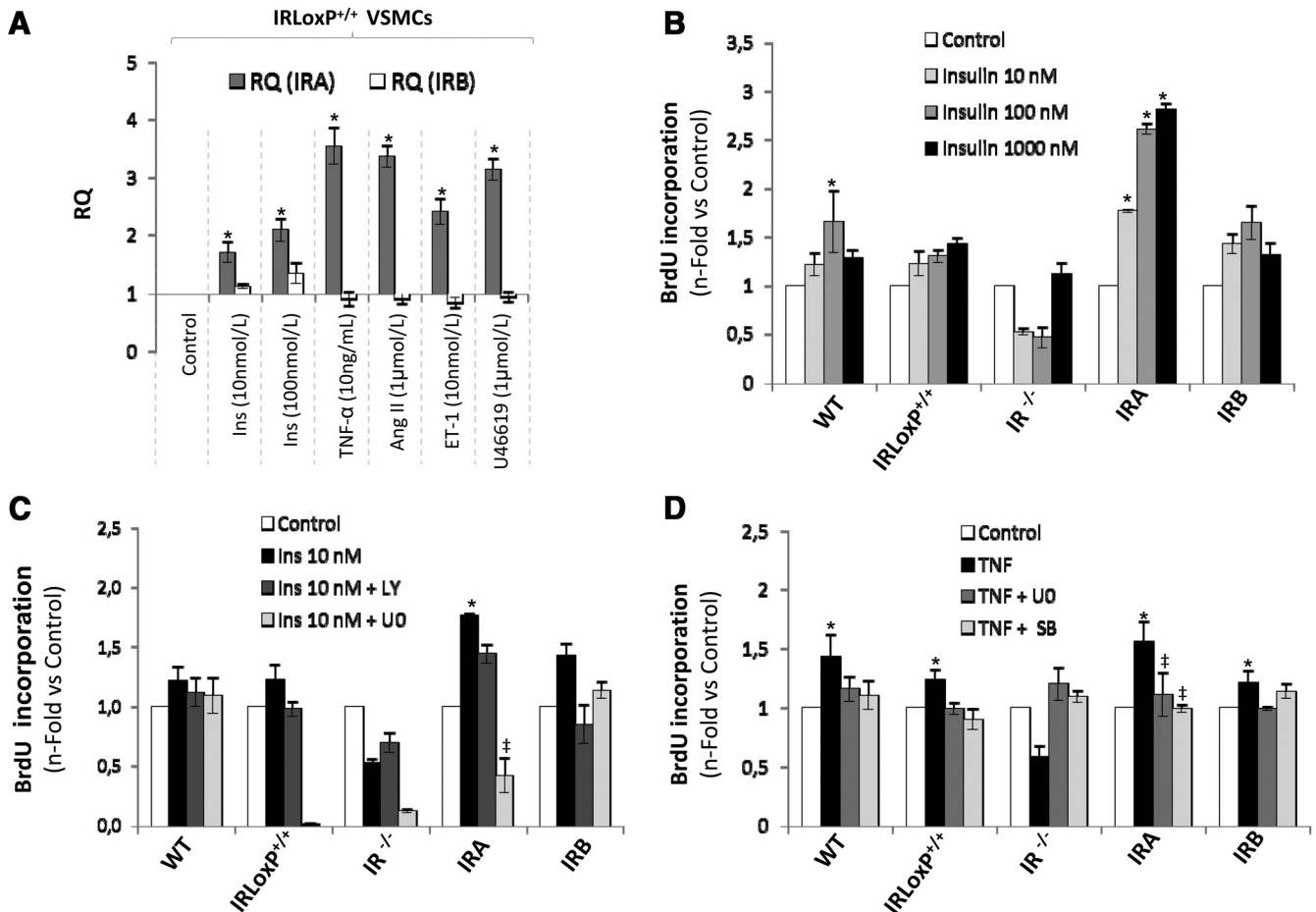


Figure 3. Role of IRA or IRB isoform and several proatherogenic stimuli in the proliferation of aortic VSMCs. A, qRT-PCR analysis of IRA and IRB isoform expression induced by insulin, TNF- α , Ang II, ET-1, and U46619 for 24 hours in IRLoxP^{+/+} VSMCs. Thus, the amount of target, normalized to endogenous gene and relative to the control is given by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta Ct = Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{endogenous gene})$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ for any sample - ΔCt for the control], where Ct is cycle threshold. B, Rates of proliferation measured by BrdU incorporation in response to insulin in a dose-dependent manner in all VSMC lines studied. C, Effect of pretreatment with ERK-MAPK inhibitor (U0126) or PI3K inhibitor (LY294002) on the rates of proliferation of VSMC lines induced by insulin (Ins) at 100 nmol/L. D, Effect of pretreatment with ERK-MAPK inhibitor (U0126) or p38-MAPK inhibitor (SB20358) on the rates of proliferation induced by TNF- α in VSMC lines. Experiments were performed 4 to 7 times. *, $P < .05$ vs control; †, $P < .05$ vs stimuli. Ct, cycle threshold; RQ, relative quantification.

PI3K inhibitor LY294002 (Figure 3C). These results suggest that insulin working on IRA isoform induced VSMC proliferation, mainly through MAPK signaling pathway. We also assessed the effect of TNF- α , angiotensin II (Ang II), ET-1, and U46619 on VSMC proliferation (Figure 3D and Supplemental Figures 2B and 3). Thus, TNF- α induced a slight proliferation of WT, IRLoxP^{+/+}, and IRB VSMCs. Ang II or ET-1 also induced slight proliferation of WT and IRLoxP^{+/+}, but no effect was observed on IRB VSMCs. However, the TXA₂ analog (U46619) did not induce proliferation in WT, IRLoxP^{+/+}, and IRB VSMCs. Nevertheless, all proatherogenic stimuli studied induced a significant increase of IRA VSMC proliferation (Figure 3D and Supplemental Figure 3). Besides, the ERK-MAPK inhibitor U0126 as well as the p38-MAPK inhibitor SB20358 significantly impaired IRA VSMC proliferation induced by proatherogenic stimuli (Figure 3D and Sup-

plemental Figure 3). These results strongly suggest the involvement of ERK and p38 signaling pathways induced by proatherogenic stimuli such as TNF- α , Ang II, ET-1, and U46619 in IRA VSMC proliferation.

Differential clustering of proatherogenic receptors by IRA or IRB isoform in aortic VSMCs

To assess whether TNF- α , Ang II, ET-1, and U46619 induced more proliferation in IRA VSMCs than in IRB VSMCs, we measured the protein levels of their receptors such as TNF-R1, TNF-R2, AT-1, ET-A, and TP. We observed that IRA VSMCs showed higher expression of AT-1, ET-A, and TP receptors than IRB VSMCs (Figure 4A and Supplemental Figure 4A). Nevertheless, the expression of TNF-Rs was similar in both cell lines (Figure 4A). Overall, a robust association of TNF-R1, TNF-R2, AT-1, ET-A, or TP with IR in IRA VSMCs was observed.

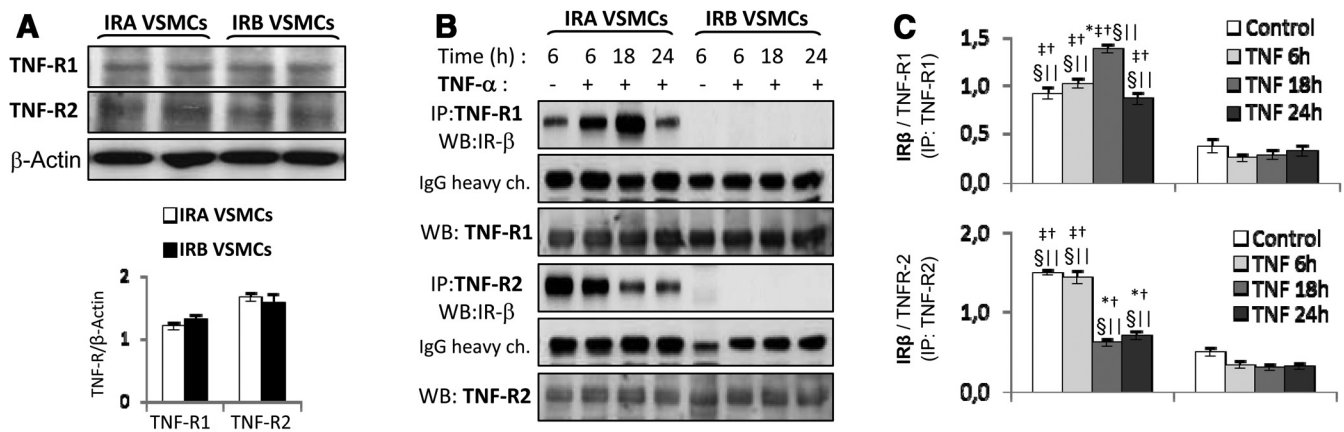


Figure 4. Differential clustering of TNF- α receptors with IRA or IRB isoform in aortic VSMCs. A, Western blot analysis of basal levels of TNF-R1 and TNF-R2. B, Representative gels. C, Quantification of TNF-R1 and TNF-R2 association with IR in response to TNF- α in a time-dependent manner, respectively. Experiments were performed at least 4 times. *, $P < .05$ vs control (IRA VSMCs); †, $P < .05$ vs control (IRB VSMCs); ‡, $P < .05$ vs 6-hour stimulus (IRB VSMCs); §, $P < .05$ vs 18-hour stimulus (IRB VSMCs); ||, $P < .05$ vs 24-hour stimulus (IRB VSMCs). Abbreviations: IP, immunoprecipitation; WB, Western blot.

No basal association of TNF-R1, TNF-R2, AT-1, or TP with IR was observed in IRB VSMCs (Figure 4, B and C, and Supplemental Figure 4, C and D). In the VSMC lines expressing only IRA isoform, TNF- α progressively increased basal association between TNF-R1 and IR in a time-dependent manner (Figure 4, B and C). Upon TNF- α binding, however, the basal association between TNF-R2 and IR was progressively decreasing in IRA VSMCs in a time-dependent manner.

IRA isoform and TNF-R1 expression as well as its association are increased in aorta artery from ApoE^{-/-} or BATIRKO mice

At this step, we wondered whether TNF- α -induced IRA isoform expression and its association with TNF-R1 observed in VSMCs (Figures 3A and 4B and Supplemental Figure 1B) could be of any relevance in vivo. To address this issue, we analyzed the expression of both IR isoforms and their associations with TNF-R1 as well as the role of TNF- α in aorta artery from 2 mouse models showing different grades of vascular damage. First, we used ApoE^{-/-} mice as an early atherosclerosis mouse model. ApoE^{-/-} mice presented a significant increase of cholesterol and triglyceride levels in plasma without significant alterations in glucose metabolism (Supplemental Figure 5A). The lesion area in aortic roots was close to 48.9% with lipid depots of 23.7% and stenosis of 32.8% (Supplemental Figure 5B). Furthermore, a significant increase of macrophage infiltration, the number of VSMCs, and PCNA staining was observed in aortic roots from ApoE^{-/-} mice (Supplemental Figure 5, A–C). In addition, we observed a significant increase of ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α , PAI-1, and IRA isoform mRNA expression, without significant changes of IRB isoform in aorta artery from

ApoE^{-/-} mice (Supplemental Figure 5D and Figure 5A). Second, we used 52-week-old BATIRKO mice showing vascular insulin resistance and dysfunction (13). These mice also had severe brown lipodystrophy, obesity, hypoinsulinemia, mild fasted hyperglycemia, and glucose intolerance without global insulin resistance due to a defect in insulin secretion (13). As previously shown, 52-week-old BATIRKO mice presented a significant increase of ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α , and PAI-1 in the aorta artery (13) and also observed a significant increase in the IRA isoform expression (Figure 5B). Furthermore, we observed significant and positive correlations between IRA isoform and ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α , or PAI-1 expression, respectively, in aorta artery from both ApoE^{-/-} and BATIRKO mice (Supplemental Figure 6). We observed a significant increase of TNF-R1 and IRA expression as well as an increased association between IRA and TNF-R1 in aorta from both ApoE^{-/-} and BATIRKO mice as compared with their corresponding control groups (Figure 5). More importantly, treatment with anti-TNF- α antibody for 6 weeks abolished IRA and TNF-R1 overexpression as well as its association observed in BATIRKO mice (Figure 5, B and D).

Role of IGF-II and IRA/IGF-IR hybrid receptors in the proliferation of VSMCs

IGF-II is implicated in the growth of atherosclerotic plaque and shows 10-fold more affinity by IRA than IRB (6, 17). Thus, we investigated the role of IGF-II in the proliferation of VSMCs. IGF-II induced a significant increase of IRA isoform and IGF-IR at mRNA expression and protein level in IRLoxP^{+/+} VSMCs (Figure 6, A and B, and Supplemental Figure 1, B and D). However, no effect was observed in response to IGF-I (Figure 6, A and

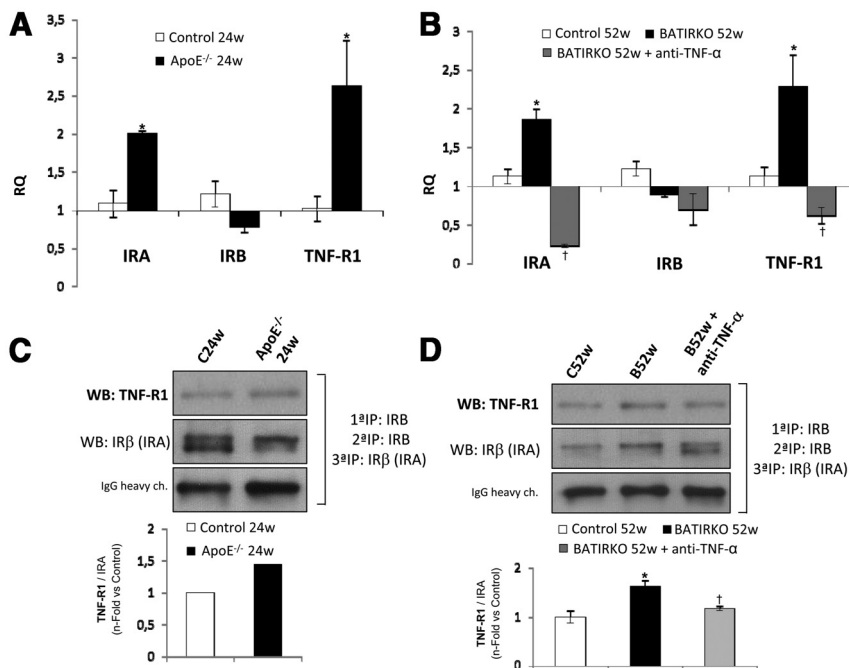


Figure 5. IR isoforms and TNF-R1 expression and its associations in aorta from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice. A and B, qRT-PCR analysis of IRA, IRB, and TNF-R1 expression in aorta from ApoE^{-/-} (A) and BATIRKO mice and anti-TNF-α-treated BATIRKO mice (B). Thus, the amount of target, normalized to endogenous gene and relative to the control is given by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta Ct = Ct$ (target gene) - Ct (endogenous gene); $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ for any sample - ΔCt for the control], where Ct is cycle threshold. C and D, Representative gels and quantification of TNF-R1 association with IRA in aorta from ApoE^{-/-} (C) and BATIRKO mice and anti-TNF-α-treated BATIRKO mice (D). For immunoprecipitation with protein extracts from the aortic samples, we had to use aortic pools from 5 ApoE^{-/-} mice and their control mice. We used individual aortas from 3 mice per group in BATIRKO mice and their control mice, and 150 μ g protein was immunoprecipitated with IRB isoform antibody. The supernatants were reimmunoprecipitated with IRB isoform antibody. The supernatants from the second immunoprecipitation were immunoprecipitated with IR β (IRA + IRB isoforms) antibody. Thus, immune complexes (only IRA) were collected on protein A-agarose beads and submitted to SDS-PAGE. Finally, the immunoblots were incubated with anti-TNF-R1 antibody to determine the association between IRA isoform and TNF-R1. Experimental animals were 24-week-old control mice (C24w; $n = 5$), 24-week-old (24w) ApoE^{-/-} mice ($n = 5$), 52-week-old control mice (C52w; $n = 6$), 52-week-old BATIRKO mice (B52w; $n = 5$), and anti-TNF-α-treated BATIRKO mice at 52 weeks of age (B52w + anti-TNF-α; $n = 3$). *, $P < .05$ vs each control; †, $P < .05$ vs 52-week-old BATIRKO mice. Abbreviations: IP, immunoprecipitation; WB, Western blot; RQ, relative quantification; Ct, cycle threshold.

B). Moreover, TNF- α significantly increased IGF-II (Figure 6C) and IGF-IR (Supplemental Figure 1D) at the protein level in IRLoxP^{+/+} VSMCs. In BrdU proliferation studies, we observed that 25 nmol/L IGF-I induced a significant increase of proliferation in all cell lines studied. Nevertheless, 25 nmol/L IGF-II induced a significant increase of proliferation in IR^{-/-} and IRA VSMCs. However, no significant effect was observed in IRLoxP^{+/+} and IRB VSMCs (Figure 6D and Supplemental Figure 2C). A step further, we studied the association between IRA or IRB and IGF-IR in IRA versus IRB VSMCs, respectively. In both cell lines, there was a basal association between IRA or IRB and IGF-IR. However, the formation of IRA/IGF-IR hybrid receptors was significantly increased only in IRA cells upon stimulation with IGF-II or TNF- α for 42

hours but not for IGF-I (Figure 6E). These results are consistent with the fact that TNF- α or IGF-II induced higher proliferation in IRA VSMCs versus IRB VSMCs (Figures 3D and 6D and Supplemental Figure 2, B and C).

IGF-IR expression as well as its association with IRA isoform are increased in aorta artery from ApoE^{-/-} or BATIRKO mice

We addressed whether IRA or IRB association with IGF-IR could be of significance under pathophysiological conditions. Thus, we observed a significant increase of IGF-IR expression and higher association between IRA and IGF-IR, but not with IRB, in aorta from ApoE^{-/-} or BATIRKO mice as compared with their corresponding control groups (Figure 7). More importantly, anti-TNF- α antibody treatment abolished IGF-IR overexpression as well as its increased association with IRA isoform observed at the aorta from 52-week-old BATIRKO mice (Figure 7, B and D).

Discussion

Increased proliferation and migration of VSMCs importantly contributes to the injury response in major blood vessels. VSMCs proliferate and migrate from the media to the intima and form a neointima with increased extracellular matrix production, leading to the development of an organized atherosclerotic plaque (18). Thus, early formation of neointima may contribute to the enhancement of inflammatory and thrombotic processes, leading to atherosclerosis in the vessel wall (19, 20).

Compared with nondiabetic subjects, type 2 diabetic individuals had accelerated atherosclerosis mainly due to the fact that diabetic VSMCs exhibit significantly increased rates of proliferation, adhesion, and migration as well as abnormal cell culture morphology (21). Thus, it is important to gain a better understanding of the molecular mechanisms and cellular changes associated with vascular injury, to determine whether the inhibition of growth and

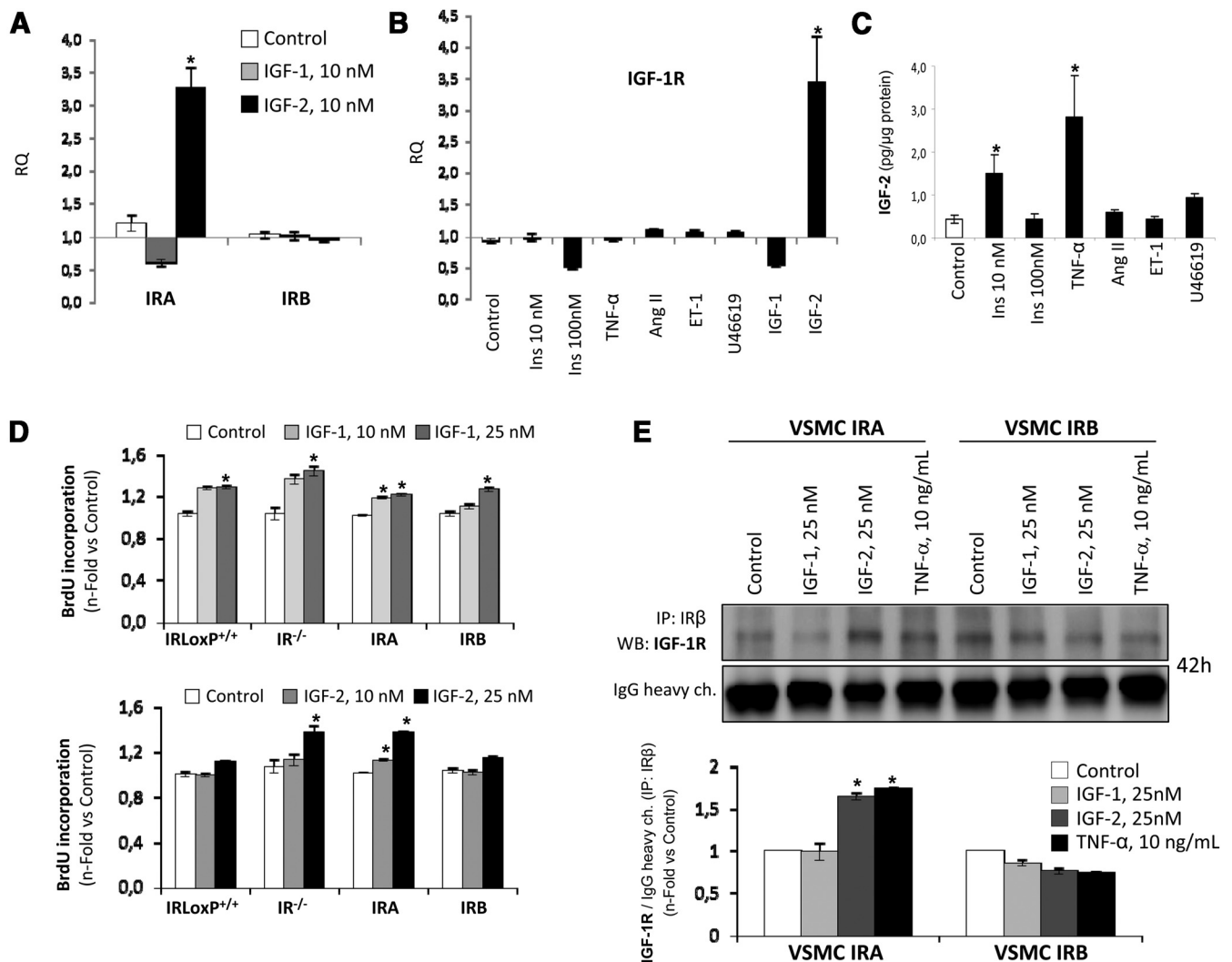


Figure 6. Role of IGF-II in the VSMC proliferation. A, qRT-PCR analysis of IRA and IRB mRNA expression in IGF-treated IRLoxP^{+/+} VSMCs for 24 hours. B, qRT-PCR analysis of IGF-IR induced by insulin, TNF-α, Ang II, ET-1, U46619, IGF-I, and IGF-II in IRLoxP^{+/+} VSMCs for 24 hours. Thus, the amount of target, normalized to endogenous gene and relative to the control is given by 2^{-ΔΔCt} [ΔCt = Ct (target gene) – Ct (endogenous gene); ΔΔCt = ΔCt for any sample – ΔCt for the control], where Ct is cycle threshold. C, IGF-II production induced by insulin and proatherogenic stimuli in supernatants of IRLoxP^{+/+} VSMCs for 24 hours. D, Rates of proliferation measured by BrdU incorporation in response to IGF-I and IGF-II in IRLoxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA, and IRB VSMC lines. E, Representative gels and quantification of IGF-IR association with IR in response to IGF-I (25 nmol/L), IGF-II (25 nmol/L), and TNF-α (10 ng/mL) for 42 hours in IRA and IRB VSMCs. *, P < .05 vs each control. Abbreviations: IP, immunoprecipitation; WB, Western blot.

migration of VSMCs in the vasculature could serve as a novel therapeutic strategy to prevent the vascular complications of diabetes (22). In this work, we addressed the issue of a better understanding of the molecular mechanisms underlying proliferation of VSMCs. Specifically, we have studied the role played by IR isoforms in this process. First, we have generated new aortic VSMC lines: WT and IRLoxP^{+/+} VSMCs (with IR), IR^{-/-} VSMCs (lacking IR), IRA VSMCs (expressing IRA isoform), and IRB VSMCs (expressing IRB isoform) and proved their functionality (insulin signaling and glucose uptake). Insulin-mediated phosphorylation of Akt and ERK, 2 major survival pathways in mammalian cells (23), was absent in immortalized IR-deficient VSMCs. Both signaling pathways were res-

cued by the reconstitution with IRA or IRB isoforms. Moreover, phosphorylation of AKT, p70, and ERK responded to insulin with higher affinity and maximal activity in IRA VSMCs than in IRB VSMCs. In this regard, we previously described that insulin induced a more sustained time course of signaling in IRA compared with IRB neonatal pancreatic β-cell lines (24). On the other hand, it was reported that the insulin-induced PI3K/Akt signaling pathway turned out in translocation of Glut-4 from cytosol to the plasma membrane (25). Our results strongly suggest that IRA, but not IRB, mediates Glut-4 translocation and glucose uptake required for cell proliferation in response to insulin.

Second, we demonstrated that insulin and proatherogenic stimuli such as TNF-α, Ang II, ET-1, and TXA₂

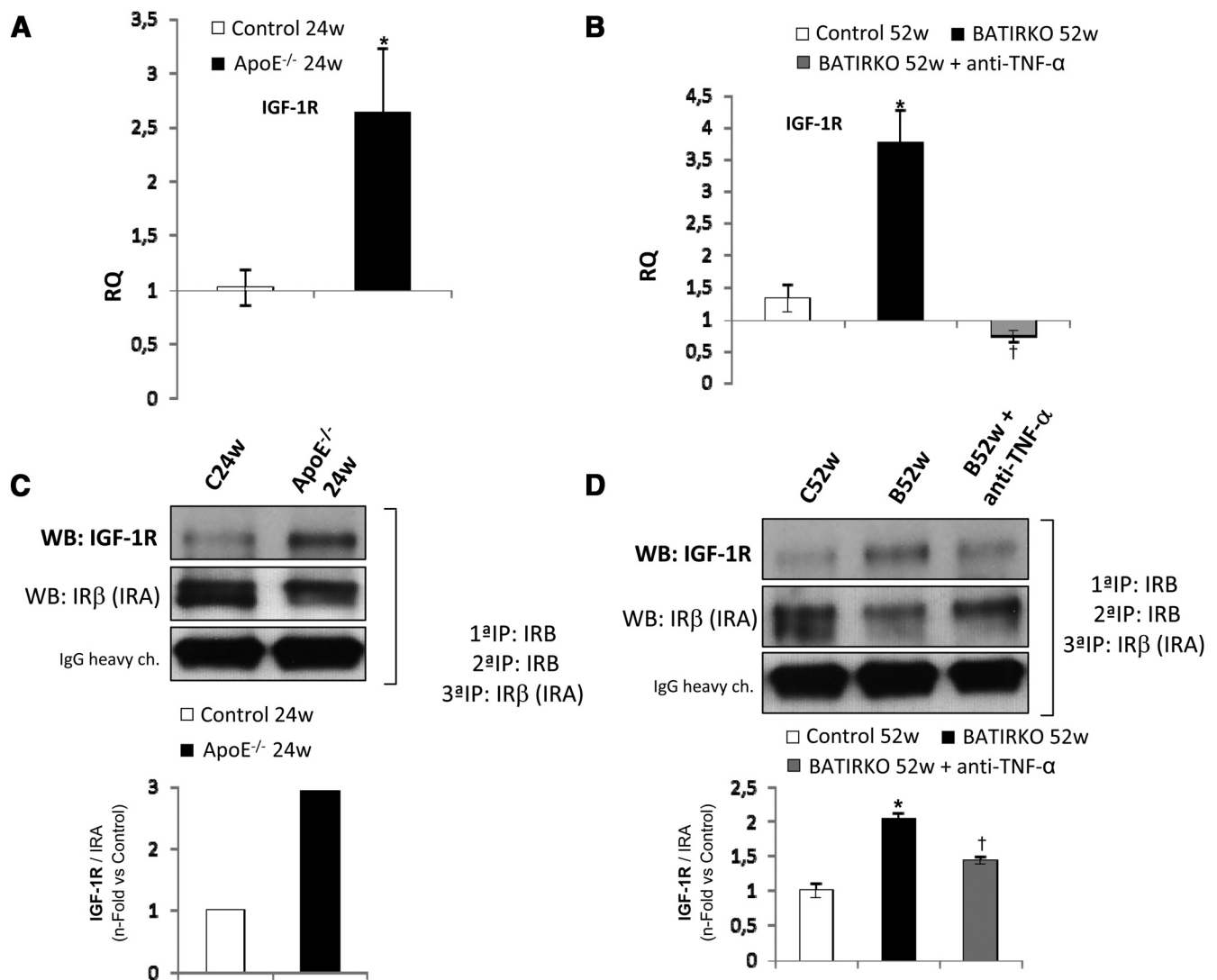


Figure 7. IGF-1R expression and its association with IRA isoform in aorta from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice. A and B, qRT-PCR analysis of IGF-1R expression in aorta from ApoE^{-/-} (A) and BATIRKO mice and anti-TNF- α -treated BATIRKO mice (B). Thus, the amount of target, normalized to endogenous gene and relative to the control is given by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta Ct = Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{endogenous gene})$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ for any sample - ΔCt for the control], where Ct is cycle threshold. C and D, Representative gels and quantification of IGF-1R association with IRA in aorta from ApoE^{-/-} (C) and BATIRKO mice and anti-TNF- α -treated BATIRKO mice (D). For immunoprecipitation with protein extracts from the aortic samples, we had to use aortic pools from 5 ApoE^{-/-} mice and their control mice. However, we used individual aortas from 3 mice per group in BATIRKO mice and their control mice, and 150 μg protein was immunoprecipitated with IRB isoform antibody. The supernatants were reimmunoprecipitated with IRB isoform antibody. The supernatants from the second immunoprecipitation were immunoprecipitated with IR β (IRA + IR β isoforms) antibody. Thus, immune complexes (only IRA) were collected on protein A-agarose beads and submitted to SDS-PAGE. Finally, the immunoblots were incubated with anti-IGF-1R antibody to determinate the association between IRA isoform and IGF-1R. Experimental animals were 24-week-old control mice (C24w; n = 5), 24-week-old (24w) ApoE^{-/-} mice (n = 5), 52-week-old control mice (C52w; n = 6), 52-week-old BATIRKO mice (B52w; n = 5), and anti-TNF- α -treated BATIRKO mice at 52 weeks of age (B52w + anti-TNF- α ; n = 3). *, $P < .05$ vs each control; \dagger , $P < .05$ vs 52-week-old BATIRKO mice. Abbreviations: IP, immunoprecipitation; WB, Western blot.

induced a higher IRA/IRB ratio, increasing IRA expression without changes in IRB expression. Moreover, we observed that insulin, mainly through the ERKs signaling pathway, induced higher proliferation in IRA VSMCs than IRB VSMCs. Numerous studies demonstrated that the ERK1/ERK2 signaling pathway has an important role in VSMC proliferation induced by insulin (26, 27). In addition, the migratory and proliferative activities of VSMCs are also regulated by growth promoters such as platelet-

derived growth factors, ET-1, thrombin, fibroblast growth factor, IL-1, TNF- α , and TXA₂ (18). In this current work, we observed that TNF- α , Ang II, ET-1, and TXA₂, mainly through ERK and p38 signaling pathways, induced higher proliferation in IRA VSMCs than IRB VSMCs. In the same way, other authors have demonstrated that TNF- α induces expression of transcription factors involved in the regulation of cellular growth, differentiation, and migration in vascular lesions through

ERK1/2 (28). Another study also demonstrated that Ang II activated ERK1/2, c-Jun N-terminal kinase, and p38 MAPK exclusively via the AT1 receptor in VSMCs (29). Moreover, the ET-A receptors predominate in the ET-1-induced activation of ERK1/2 in human VSMCs, which associates with increments in intracellular protein kinase C, protein kinase A, and PI3K activities (30).

Regarding proatherogenic receptors, TNFRs, AT-1, ET-A, and TP receptors might mediate cell proliferation in VSMCs induced by TNF- α , Ang II, ET-1, and TXA₂, respectively (28–33). Firstly, higher protein levels of AT-1, ET-A, and TP receptors in IRA VSMCs in relation to IRB VSMCs might facilitate proliferation of those cells bearing IRA receptors in response to Ang II, ET-1, and TXA₂, respectively. In this regard, it has been described that the upregulation of ET-A on VSMCs, as observed in atherosclerosis, might lead to an increase in signal transduction (34). Thus, AT-1 receptors are increased and colocalized in major cellular components of early atherosclerotic lesions and atheromatous plaques during the development and progression of human coronary disease (35). TP receptor within the early and more advanced aortic atherosclerotic lesion was significantly increased compared with controls and associated mainly with SMCs (36). A step further, we studied the association of IR isoforms with TNF-Rs, AT-1, ET-A, or TP, and in all cases, there was a higher basal association in IRA VSMCs than IRB VSMCs. This fact might also contribute to higher proliferative response observed in IRA VSMCs compared with IRB VSMCs. Moreover, TNF- α increased the basal association between IRA and TNF-R1 in a time-dependent manner in IRA VSMCs. In this sense, TNF-R1 shows a much higher affinity to TNF- α as compared with TNF-R2 (37). Data shown above suggest that the IRA isoform and its association with TNF-R1 confer proliferative advantage to VSMCs. At this stage, we wondered whether these facts could be of significance *in vivo*. Thus, we observed a significant increase of IRA isoform expression in aorta artery from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice. In addition, there was a significant and positive correlation between IRA expression and markers of vascular dysfunction, inflammation, and oxidative stress. These results suggest the involvement of IRA isoform, but not IRB, in the atherosclerotic process due to the proliferative advantage that this isoform confers to VSMCs. In this regard, other studies also showed that IRA played a major role in proliferative processes such as cancer (38) and the β -cell hyperplasia associated with insulin resistance (9). In addition, an increase of TNF-R1 and higher association between IRA and TNF-R1 were found in aorta from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice. More importantly, anti-TNF- α treatment diminished the expression of both receptors as well as its association in

BATIRKO mice. These results strongly suggest that the association between IRA and TNF-R1 mediates the proliferation of VSMCs induced by TNF- α . In this regard, previous studies have described that TNF-R1 signaling, particularly in the arterial wall cells, contributes to the early phases, or rapidly developing phases, more than later phases of plaque growth by enhancing arterial wall chemokine and adhesion molecule expression as well as by augmenting medial SMC proliferation and migration (39).

On the other hand, the IRA isoform might also contribute to the atherosclerotic process mediating proatherogenic actions of IGF-II. It is well established that the IRA isoform binds IGF-II with more than 10-fold higher affinity than the IRB (6), and it has been implicated in a positive autocrine/paracrine loop, resulting in cell proliferation in IGF-II-producing tumors (40). Thus, IRA/IGF-IR hybrid receptors are strongly activated by IGF-I and IGF-II, whereas the IRB/IGF-IR hybrid receptors are strongly activated by IGF-I and weakly activated by IGF-II (41). In the current paper, we have demonstrated *in vitro* that IGF-II, or TNF- α indirectly through IGF-II, induced IRA and IGF-IR overexpression as well as an increase of IRA/IGF-IR hybrid receptors in VSMCs. More importantly, we have described a significant increase in the expression of IRA and IGF-IR as well as a higher formation of IRA/IGF-IR hybrid receptors in aorta from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice as compared with their corresponding controls. Given the fact that IGF-II is a pivotal promoter in the growth of the atherosclerotic lesion (17), it is feasible that the abundance of IRA receptors could facilitate the formation of IRA/IGF-IR hybrid receptors allowing IGF-II signaling. Other authors have previously described an increased level of IGF-IR expression in SMCs of atherosclerotic plaques of rabbit aortas (42), as we have currently observed in aorta from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice. In this regard, IGF-IR and the formation of hybrid receptors with the IRA isoform may be contributing to the proliferation of VSMCs involved in the early phases of plaque growth. In contrast, IGF-I and IGF-IR are decreased in advanced atherosclerotic plaques and might contribute to triggering VSMC apoptosis, potentially leading to plaque weakening, plaque rupture, and acute coronary events (43, 44).

Finally, a significant increase of IRA/IGF-IR hybrid receptors in aorta from ApoE^{-/-} and BATIRKO mice might contribute to the development of vascular insulin resistance. Thus, the regulation of IGF-IR expression may impact cellular insulin sensitivity. In this sense, the downregulation of IGF-IR increases the fraction of IRs organized in holoreceptors, which leads to enhanced insulin signaling and unmasks potential anti-inflammatory

properties of insulin in VSMCs (45). In this respect, we have demonstrated that anti-TNF- α -treated BATIRKO mice show a significant decrease of IRA and IGF-IR expression, fewer IRA/IGF-IR hybrid receptors in aorta, and an amelioration of vascular insulin resistance (13).

In conclusion, our data strongly suggest that the IRA isoform and the formation of hybrid receptors with TNF-R1 or IGF-IR, but not IRB, confers a proliferative advantage to aortic VSMCs, mainly in response to TNF- α or IGF-II, which might be involved in the early atherosclerotic process.

Acknowledgments

We thank Dr Sesti and Dr Hribal for providing us with the anti-IRB antibody.

Address all correspondence and requests for reprints to: Manuel Benito or Almudena Gómez-Hernández, Biochemistry and Molecular Biology Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid 28040, Spain. E-mail: benito@farm.ucm.es or almunenagomez@farm.ucm.es.

This work was supported by Grants SAF2007/60058, SAF2008/00031, and SAF2011/22555 from Ministerio de Ciencia e Innovación, Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423), and Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, Spain.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Myers MG Jr, White MF. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:615–658.
- Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev*. 1997;11:701–713.
- Seino S, Bell GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;159:312–316.
- Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol*. 1989;3:1263–1269.
- Goldstein BJ, Dudley AL. The rat insulin receptor: primary structure and conservation of tissue-specific alternative messenger RNA splicing. *Mol Endocrinol*. 1990;4:235–244.
- Frasca F, Pandini G, Scalia P, et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol*. 1999;19:3278–3288.
- Belfiore A. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des*. 2007;13:671–686.
- Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, Ullrich A, Häring HU. The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;177:1013–1018.
- Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. β -Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes*. 2009;58:820–828.
- Sciaccia L, Prisco M, Wu A, Belfiore A, Vigneri R, Baserga R. Signaling differences from the A and B isoforms of the insulin receptor (IR) in 32D cells in the presence or absence of IR substrate-1. *Endocrinology*. 2003;144:2650–2658.
- Kosaki A, Webster NJ. Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem*. 1993;268:21990–21996.
- Nevado C, Benito M, Valverde AM. Role of insulin receptor and balance in insulin receptor isoforms A and B in regulation of apoptosis in simian virus 40-immortalized neonatal hepatocytes. *Mol Biol Cell*. 2008;19:1185–1198.
- Gómez-Hernández A, Otero YF, de las Heras N, et al. Brown fat lipotrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction. *Endocrinology*. 2012;153:1242–1255.
- Guerra C, Navarro P, Valverde AM, et al. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest*. 2001;108:1205–1213.
- López-Franco O, Hernández-Vargas P, Ortiz-Muñoz G, et al. Parthenolide modulates the NF- κ B-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1864–1870.
- Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor- κ B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation*. 1997;95:1532–1541.
- Zaina S, Pettersson L, Ahrén B, et al. Insulin-like growth factor II plays a central role in atherosclerosis in a mouse model. *J Biol Chem*. 2002;277:4505–4511.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801–809.
- Ross R. Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis*. 1997;131(Suppl 1):S3–S4.
- Schwartz SM. The intima: a new soil. *Circ Res*. 1999;85:877–879.
- Faries PL, Rohan DJ, Takahara H, et al. Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. *J Vasc Surg*. 2001;33:601–607.
- Hsueh WA, Jackson S, Law RE. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR- γ : a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24:392–397.
- Siddell K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol*. 2011;47:R1–R10.
- Bartolomé A, Guillén C, Benito M. Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation. *Endocrinology*. 2010;151:3084–3094.
- Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1597–H1602.
- Isenovi ER, Soski S, Trpkovi A, et al. Insulin, thrombin, ERK1/2 kinase and vascular smooth muscle cells proliferation. *Curr Pharm Des*. 2010;16:3895–3902.
- Breen DM, Giacca A. Effects of insulin on the vasculature. *Curr Vasc Pharmacol*. 2011;9:321–332.
- Goetze S, Kintscher U, Kaneshiro K, et al. TNF α induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis*. 2001;159:93–101.
- Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:940–948.
- Chen QW, Edvinsson L, Xu CB. Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC Cell Biol*. 2009;10:52.

31. Hafizi S, Chester AH, Allen SP, Morgan K, Yacoub MH. Growth response of human coronary smooth muscle cells to angiotensin II and influence of angiotensin AT1 receptor blockade. *Coron Artery Dis.* 1998;9:167–175.
32. Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, Chester AH, Yacoub MH. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis.* 1999;146:351–359.
33. Ko FN, Yu SM, Kang YF, Teng CM. Characterization of the thromboxane (TP-) receptor subtype involved in proliferation in cultured vascular smooth muscle cells of rat. *Br J Pharmacol.* 1995;116:1801–1808.
34. Winkles JA, Alberts GF, Brogi E, Libby P. Endothelin-1 and endothelin receptor mRNA expression in normal and atherosclerotic human arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;191:1081–1088.
35. Ohishi M, Dusting GJ, Fennessy PA, Mendelsohn FA, Li XC, Zhuo JL. Increased expression and co-localization of ACE, angiotensin II AT(1) receptors and inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic human coronary arteries. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2010;2:111–124.
36. Cyrus T, Ding T, Praticò D. Expression of thromboxane synthase, prostacyclin synthase and thromboxane receptor in atherosclerotic lesions: correlation with plaque composition. *Atherosclerosis.* 2010;208:376–381.
37. Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:570–575.
38. Denley A, Wallace JC, Cosgrove LJ, Forbes BE. The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm Metab Res.* 2003;35:778–785.
39. Zhang L, Peppel K, Sivashanmugam P, et al. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1087–1094.
40. Sciacca L, Costantino A, Pandini G, et al. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene.* 1999;18:2471–2479.
41. Pandini G, Vigneri R, Costantino A, et al. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1935–1944.
42. Polanco JI, Albajar M, Pocoví M, Rodríguez Rey JC. Induction of insulin-like growth factor receptor (IGF IR) mRNA levels by low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226:917–922.
43. von der Thüsen JH, Borensztajn KS, Moimas S, et al. IGF-1 has plaque-stabilizing effects in atherosclerosis by altering vascular smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol.* 2011;178:924–934.
44. Okura Y, Brink M, Zahid AA, Anwar A, Delafontaine P. Decreased expression of insulin-like growth factor-1 and apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaque. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:1777–1789.
45. Engberding N, San Martín A, Martín-Garrido A, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor expression masks the antiinflammatory and glucose uptake capacity of insulin in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:408–415.



Make sure your patients are getting the best medical care. Learn more about The Endocrine Society's *The Evaluation of Thyroid Nodules Practice Improvement Module(PIM)*.

www.endoassessment.org