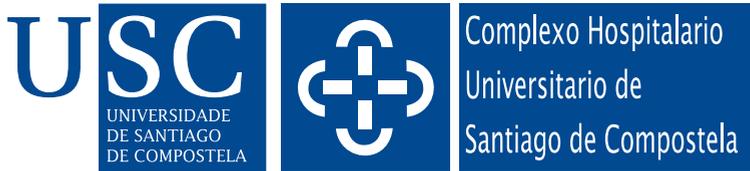


**Universidad de Santiago de Compostela  
Hospital Clínico Universitario de Santiago de  
Compostela**



**Efectos hormonales sobre la  
viabilidad y el metabolismo  
de los cardiomiocitos:  
Hormona de Crecimiento y  
Adiponectina**

**Roberto Piñeiro Cid**



Doña María Francisca Lago Paz, Investigadora contratada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, y Don José Ramón González Juanatey, Catedrático de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN QUE:

La presente Tesis Doctoral titulada “Efectos hormonales sobre la viabilidad y el metabolismo de los cardiomiocitos: Hormona de Crecimiento y Adiponectina”, ha sido realizada bajo su dirección en la Unidad de Investigación en Cardiología Celular y Molecular del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela), estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que conste, se firma la presente autorización en Santiago de Compostela, Septiembre 2005.

Fdo: M<sup>a</sup> Francisca Lago Paz

Fdo: José Ramón González Juanatey

Fdo: Roberto Piñeiro Cid



## **Agradecimientos**

Gracias a Fran y a Ramón por darme la oportunidad de trabajar en ciencia, por su dirección en este trabajo, y por todo el conocimiento que han aportado a mi formación como investigador.

Gracias a Chus, por haber compartido pipetas conmigo desde tiempos ancestrales, por cada una de las veces que me ha ayudado, por su compañía en el laboratorio y su amistad día tras día, y porque aún no entiendo como después de tanto tiempo me sigue aguantando. Espero seguir viéndote.

Gracias a Eva y a Miguel, por todo el apoyo que me han dado, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, y por ser cómplices en esta aventura. Que os vaya bien.

Gracias a Carlos, Piti y Sonia, por todos los cables que me han echado en el laboratorio y por su compañía en el día a día. Con vosotros es sencillo trabajar.

Gracias a Ángel, por dejarnos invadir su territorio y por las mil y una veces que desinteresadamente ha prestado su ayuda, y gracias por todas esas tardes de conciertos con las que amenizaba el trabajo.

Gracias a Oreste, Antonio y Carmen, por toda su ayuda que me ha servido para conocer mejor este mundillo.

Gracias a todos los chicos y chicas de los laboratorios de investigación y servicio de cardiología del Clínico por el buen ambiente que entre todos han creado, y porque más que compañeros, son amigos.

Gracias a la gente del departamento de Fisiología, ya que es allí donde hice mis primeros pinitos en esto de la investigación. En particular quiero dar la gracias a Rubén, Eduardo, Sulay, Samuel y Marcos, por el tiempo que me han dedicado dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a Tomás Caballero y Rosalía Gallego del departamento de Histología por su colaboración en los trabajos de inmunohistoquímica.

Gracias al Dr. Paul A Kelly por recibirme en su laboratorio de Paris, y permitirme el trabajar con él.

Gracias a Pablo, por la innumerable cantidad de horas que me ha dedicado todos estos años desde que llegamos juntos a Santiago, y sobre todo por su amistad.

Y gracias a Isa,

porque a su lado, esta tesis ha sido más fácil.



A mis padres y a mis hermanos



## ÍNDICE

### Introducción general

1. Estructura y biología de los cardiomiocitos	3
2. Modelos cardiomiocitarios experimentales utilizados en investigación	7
3. La hipertrofia cardíaca	9
4. Implicaciones de la matriz extracelular sobre la funcionalidad del cardiomiocito	11
5. Muerte celular y cardiomiocitos: la apoptosis	13
5.1. Apoptosis cardiomiocitaria	15
6. Regulación hormonal a nivel cardíaco	17
6.1. Péptidos natriuréticos	17
6.2. Aldosterona	18
6.3. Adrenomedulina	19
6.4. Leptina	20
6.5. Ghrelina	20

### Introducción Hormona de Crecimiento (GH)

1. Estructura y localización	25
2. Producción y secreción	25
3. Receptor de GH y proteínas transportadoras de GH (GHBP)	26
4. Efectos de la GH	29
4.1. Efectos cardíacos del eje GH/IGF-1	30
5. GH e hipertrofia cardíaca	31
6. GH y contractilidad y viabilidad cardiomiocitaria	32
7. Exceso y deficiencia de GH y función cardíaca	33
7.1. Exceso de GH	33
7.2. Deficiencia de GH	36
8. GH y apoptosis	37

### Objetivos Hormona de Crecimiento

Objetivos Hormona de Crecimiento	43
----------------------------------	----

### Material y Métodos Hormona de Crecimiento

1. Cultivos celulares	47
1.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata	47
1.2. Línea celular de ratón HL-1	48
2. Técnicas utilizadas	49

2.1. Extracción de ARN mediante TRIzol®	49
2.2. Tratamiento con DNAsas	50
2.3. Extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico	51
2.4. Retrotranscripción (RT)	51
2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	52
2.6. Unión específica ligando-receptor (GH-GHR) en células HL-1	52
2.7. Inmunoprecipitación y Western Blot	53
2.8. Técnicas para la detección de apoptosis	57
2.8.1. Citometría de flujo	57
2.8.2. Análisis de la fragmentación del ADN por electroforesis o “DNA ladder”	58
2.8.3. Ensayo TUNEL	59
2.8.4. Tinción vital Hoechst	60
2.9. Ensayo de proliferación MTT	61
2.10. Radioinmunoensayo de IGF-1	62
3. Análisis estadístico	64

### **Resultados Hormona de Crecimiento**

1. Expresión del receptor de GH (GHR) por cardiomiocitos en cultivo primario, y unión ligando-receptor en cardiomiocitos HL-1	69
2. Efecto de la GH en células HL-1 sobre la activación de GHR, JAK2 y STAT5	69
3. Efecto de la GH sobre la apoptosis en cardiomiocitos	70
3.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata	70
3.2. Línea celular HL-1	71
4. Efectos directos de la GH sobre cardiomiocitos HL-1	72
5. Papel de la calcineurina sobre el efecto de la GH en células HL-1	72
6. p38 MAPK como mediador del efecto de AraC	74

### **Discusión Hormona de Crecimiento**

Discusión Hormona de Crecimiento	85
----------------------------------	----

### **Conclusiones Hormona de Crecimiento**

Conclusiones Hormona de Crecimiento	103
-------------------------------------	-----

### **Introducción Adiponectina**

1. Historia	107
2. Estructura proteica	107
3. Localización cromosómica	109

4. Características generales del tejido adiposo	110
5. Síntesis de adiponectina	112
6. Receptores de adiponectina	113
6.1. Regulación de los receptores de adiponectina	115
7. Mecanismos de acción de adiponectina	116
7.1. Quinasa dependiente de AMP (AMPK)	116
8. Sistema cardiovascular y adipocitoquinas	119
8.1. Obesidad, diabetes y síndrome metabólico	120
8.2. Regulación de los niveles de adiponectina en plasma y tejido adiposo por factores de riesgo cardiovascular	123
9. Efectos metabólicos de adiponectina	126
9.1. Metabolismo de la glucosa	126
9.1.1. Tiazolidinedionas y adiponectina	128
9.2. Metabolismo de lípidos	129
10. Propiedades anti-aterogénicas y anti-inflamatorias de adiponectina	132
11. Efectos de la adiponectina sobre la producción de óxido nítrico	135

### **Objetivos Adiponectina**

Objetivos Adiponectina	139
------------------------	-----

### **Material y Métodos Adiponectina**

1. Cultivos celulares	143
1.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata	143
1.2. Línea celular de ratón HL-1	143
1.3. Cultivo primario de cardiomiocitos humanos	143
2. Técnicas utilizadas	143
2.1. Extracción de ARN mediante TRIzol®	143
2.2. Tratamiento con DNAsas	144
2.3. Extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico	144
2.4. Retrotranscripción (RT)	144
2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	144
2.6. Western Blot	144
2.6.1. AMPK	144
2.6.2. iNOS	144
2.7. Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica	146
2.7.1. Inmunohistoquímica de adiponectina	147
2.7.2. Inmunohistoquímica de receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2	147

2.7.3. Doble inmunofluorescencia	148
2.8. Tinción Vital Hoechst	149
2.9. Ensayo de viabilidad MTT	149
2.10. Radioinmunoensayo de adiponectina	149
2.11. Ensayos de captación de glucosa	151
2.11.1. Línea celular HL-1	151
2.11.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata	152
2.12. Análisis de la secuencia de adiponectina y AdipoR1 y AdipoR2	153
2.13. Determinación de nitritos: Ensayo colorimétrico de Griess	154
2.14. Ensayo de captación de ácidos grasos: BODIPY	156
3. Análisis estadístico	156

### **Resultados Adiponectina**

1. Expresión de los genes de adiponectina y receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) por cardiomiocitos	163
2. Síntesis de adiponectina y receptores de adiponectina por cardiomiocitos	164
3. Secreción de adiponectina por cardiomiocitos HL-1 y cardiomiocitos humanos en cultivo primario	165
4. Efecto de adiponectina sobre la captación de glucosa por cardiomiocitos	166
4.1. Línea celular HL-1	166
4.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata	167
5. Papel de la AMPK en el efecto de adiponectina	167
6. Efecto de la inhibición de AMPK sobre la captación de glucosa	167
7. Efecto de adiponectina sobre la captación de ácidos grasos por cardiomiocitos	168
8. Efecto de adiponectina sobre la viabilidad y proliferación de cardiomiocitos	168
9. Efecto de adiponectina sobre la producción de óxido nítrico por cardiomiocitos neonatales de rata	169
10. Acción de adiponectina sobre la sintasa de óxido nítrico inducible iNOS	170

### **Discusión Adiponectina**

Discusión Adiponectina	185
------------------------	-----

### **Conclusiones Adiponectina**

Conclusiones Adiponectina	203
---------------------------	-----

### **Bibliografía**

Bibliografía	207
--------------	-----

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



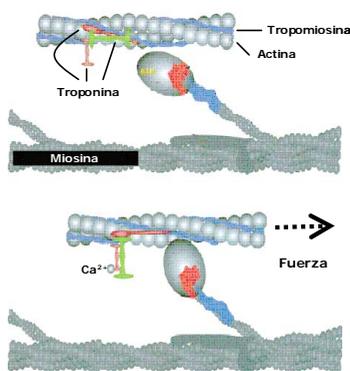
## 1. Estructura y biología de los cardiomiocitos

La relevancia de los cardiomiocitos como tipo celular radica en su organización estructural. Esta organización les va a permitir desarrollar su función principal, la contracción, capaz de mantener el ritmo cardíaco. En este hecho es determinante el papel del citoesqueleto.

El citoesqueleto se refiere al conjunto de proteínas fibrosas que están en el citoplasma celular proporcionando a la célula firmeza y rigidez, y controlando el movimiento que se produce dentro de las mismas (Roberts R. 2000). El citoesqueleto del cardiomiocito proporciona el soporte necesario para la colocación ordenada de las sarcómeras, tanto en el músculo cardíaco estriado como en el esquelético. Las proteínas del citoesqueleto se subdividen en tres clases principales de acuerdo con el tamaño, así hablamos de microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios. Los tres tipos de proteínas están presentes en todos los tipos celulares, pero los microfilamentos desempeñan una función fundamental en los cardiomiocitos. Los microfilamentos están formados por la actina, proteína filamentosa cuya agrupación junto con la miosina dará lugar a las sarcómeras. Las sarcómeras se consideran las unidades básicas que intervienen en la contracción del cardiomiocito. Por tanto, las fibras musculares están conformadas por múltiples sarcómeras, separadas entre sí por unas regiones denominadas discos Z (Roberts R, 2000).

Los filamentos de actina junto con la tropomiosina y las troponinas están formando los denominados filamentos delgados, mientras que la miosina da lugar a los filamentos gruesos. Este complejo supone la base estructural de las sarcómeras (de Tombe PP. 2003). Las sarcómeras representan aproximadamente el 50% de la masa del cardiomiocito. El funcionamiento de estas unidades se basa en los ciclos de deslizamiento de los filamentos de actina sobre la miosina, lo que supondrá la contracción. Este proceso se da en respuesta a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplásmico, siendo por tanto éste el activador de la maquinaria de contracción (de Tombe PP. 2003). Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado, se induce contracción, y cuando se secuestra, induce relajación. Los ciclos de contracción y relajación son un proceso dependiente de ATP (Roberts R. 200). En el estado relajado, la unión entre la miosina y la actina se ve impedida por la presencia de la tropomiosina y la troponina, proteínas

que están bloqueando los sitios de unión de la actina a la miosina. La liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  induce el desbloqueo de estos sitios de unión de forma que se permite la interacción entre la actina y la miosina. La unión resultante de estas dos produce un incremento en la acción ATPasa de la miosina que hidroliza el ATP a ADP. La liberación de ADP induce un incremento en la unión de la actina y la miosina. De esta forma se produce un cambio estructural que origina el movimiento de los filamentos de actina. Seguidamente el  $\text{Ca}^{2+}$  es secuestrado por el retículo sarcoplasmático y el ATP se une de nuevo a la cabeza de miosina, el cual inhibe la unión a la actina, relaja la sarcómera y reinicia la diástole (Roberts R. 2000, de Tombe PP. 2003) (Figura 1).



**Figura 1. Estructura de la sarcómera.**

El corazón es un órgano cuyo crecimiento es un proceso dinámico que ocurre durante la embriogénesis, desarrollo postnatal, madurez y senescencia; y este crecimiento se da en respuesta a cambios medioambientales y condiciones patológicas. El crecimiento cardíaco ocurre a nivel celular como una consecuencia de la interacción entre dos procesos o una combinación de ambos. El primero de estos procesos es la hiperplasia celular, que consiste en un incremento en el número de células que forman el órgano, y el segundo es la hipertrofia, que consiste en el aumento del tamaño celular (Figura 2) (Walsh RA. 2000).



**Figura 2. El crecimiento cardíaco ocurre por acción conjunta de la hiperplasia y la hipertrofia.**

Durante el desarrollo temprano, en estadios embrionarios y fetales, prácticamente todas las células proliferan y a su vez incrementan su tamaño. A lo largo de este proceso, algunas de ellas abandonan el ciclo celular, cesa la hiperplasia, y sufren el proceso de diferenciación. En el nacimiento, o en semanas posteriores a éste, algunas células de órganos como el corazón o cerebro, pierden relativamente su capacidad para proliferar, y su crecimiento se ve restringido principalmente al crecimiento de tipo hipertrófico, pero no al hiperplásico. En el caso de humanos la proliferación cesa a partir de la tercera semana, cosa que en ratas ocurre aproximadamente al tercer día (Roberts R. 2000).

Las dos formas de crecimiento celular, hiperplasia e hipertrofia, se modulan por procesos apoptóticos, o de muerte celular programada (Vaux DL et al. 1996). Este fenómeno va a tener una importancia capital en la posterior determinación de la forma del corazón, así como en la formación y estructura de la cavidad durante la cardiogénesis. Mediante este proceso de apoptosis se consigue un modelado del órgano, y se evita un crecimiento deformado de las células cardíacas que pueda acabar dando lugar a una patología. La apoptosis también podría contribuir a la formación de un corazón cuya geometría se viese alterada por la respuesta a una serie de estímulos patológicos (Thompson CB. 1995, Vaux DL et al. 1996).

Tanto el crecimiento cardiovascular fisiológico como patológico están generalmente mediados por programas de desarrollo, deformación mecánica, y lesiones en varias combinaciones. Estos procesos estimulan un conjunto de señales bioquímicas que alteran el fenotipo cardiovascular. La hipertrofia cardíaca es un proceso en el que se da un incremento de la masa del corazón producido principalmente por un aumento en el tamaño de los

cardiomiocitos diferenciados terminalmente. Aunque las células del miocardio son sólo una tercera parte del total de número de células que forman el corazón, ocupan aproximadamente un 70 % del volumen total cardíaco (Walsh RA. 2000).

La hipertrofia cardíaca se puede clasificar en fisiológica y en patológica. La hipertrofia fisiológica comprende cardiogénesis durante el desarrollo embrionario, crecimiento cardíaco postnatal, un pequeño incremento adicional de la talla del corazón que se desarrolla durante la senescencia, y el incremento de talla cardíaca que ocurre como respuesta a un condicionamiento atlético. Durante todo el período embrionario y tras unas pocas semanas después del nacimiento, el crecimiento cardíaco ocurre principalmente como consecuencia de la hipertrofia de los miocitos. Clásicamente, los cardiomiocitos adultos se consideraban células diferenciadas terminalmente, es decir, células arrestadas en el ciclo celular incapaces de reiniciarlo de nuevo. Por tanto, el crecimiento de los miocitos bajo condiciones fisiológicas y patológicas, se veía exclusivamente restringido a la hipertrofia celular (Walsh RA. 2000). Últimamente esta idea se ha revisado, postulando una posible vuelta a la división celular en modelos celulares que se consideraban diferenciados, como es el caso de los cardiomiocitos; partiendo de la base de lograr iniciar la replicación del ADN. Diversos trabajos han estudiado el papel de moléculas y genes reguladores del ciclo celular y la importancia que tienen en el arresto al que están sometidos los miocitos adultos (Kang MJ et al. 1997, Pajak L et al. 1997, Georgescu SP et al, 1997, Engel FB et al. 1999). Así, se comprobó cómo es posible iniciar la replicación del ADN *in vitro* mediante la estimulación de las células con factores nucleares y citoplasmáticos obtenidos de células en fase S del ciclo celular, lo que sugiere que el bloqueo que sufre el ciclo de estas células es reversible (Engel FB et al. 1999). Por tanto, la posibilidad de reactivar la hiperplasia en los cardiomiocitos diferenciados terminalmente es un área de gran interés en investigación, con importantes implicaciones terapéuticas en patologías como la hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Field LJ. 1988). Este área de trabajo posibilitaría el desarrollo de terapias nuevas como podría ser el trasplante de células cultivadas *in vitro* a zonas dañadas, sin tener que llegar a reemplazar la totalidad del órgano (Leiden JM. 1999).

Para aclarar el concepto de “diferenciados terminalmente”, es fundamental distinguir entre síntesis de ADN y división celular. Hay pocas evidencias que indiquen que los cardiomiocitos son capaces de dividirse bajo condiciones normales después del período postnatal más temprano, pero la utilización de técnicas nuevas como la microscopía confocal, ha permitido identificar poblaciones de miocitos mitóticos en el corazón normal (Kajstura J et al. 1998). Asimismo, se ha demostrado que, bajo distintas condiciones patológicas como insuficiencia cardíaca o infarto de miocardio, estas poblaciones celulares aumentan su capacidad de sufrir mitosis (Kajstura J et al. 1998, Beltrami AP et al. 2001). Estos resultados irían en contra de la idea original de que el corazón es un órgano postmitótico, y sugieren la continua renovación de células durante la vida del individuo (Beltrami AP et al. 2001).

Actualmente, los esfuerzos en este sentido se centran en el estudio de las células madre con capacidad multipotencial. La identificación y aislamiento que se ha hecho de estas células en el corazón adulto, capaces de entrar en fase de división al ser estimuladas con factores de crecimiento, son una muestra evidente de que el corazón se encuentra en un proceso continuo de crecimiento, muerte y renovación celular (Nadal-Ginard B. 2001). Se sabe que la mayoría de miocitos adultos presentes en el corazón están diferenciados terminalmente, sin embargo existe una pequeña población de miocitos con capacidad de división que continuamente se están renovando, y que se generan a partir de la diferenciación de células madre cardíacas (Células stem) (Nadal-Ginard B et al. 2003). Es enorme la cantidad de publicaciones que han surgido en estos últimos años al respecto, donde posiblemente el principal objetivo que se ha contemplado es la regeneración del miocardio dañado (Muller P et al. 2005).

## **2. Modelos cardiomiocitarios experimentales utilizados en investigación**

La evolución sufrida en el campo de la cardiología clínica en las últimas décadas es la consecuencia en parte de los esfuerzos realizados en el ámbito de la investigación básica. Esta evolución ha generado la necesidad de un mayor conocimiento de la biología del corazón y de los tipos celulares que lo componen. En este sentido, ha sido muy importante el hecho de que se haya logrado obtener una herramienta de trabajo importante como son las líneas celulares

cardiomiocitarias. En los primeros trabajos de investigación realizados para el estudio de la biología cardíaca *in vitro*, se utilizaron cardiomiocitos aislados de embriones o neonatos de rata, los cuales eran un modelo limitado ya que pierden algunas de las características de los cardiomiocitos adultos. Además, estas células presentan el problema de poseer una capacidad de división limitada. Trabajos posteriores utilizaron células madre embrionarias murinas y células de carcinoma embrionario P19, cuyo problema era la falta de pureza en la población celular. A partir de este momento se desarrollaron técnicas de obtención, partiendo de células madre, de poblaciones de mayor pureza, y técnicas para la inmortalización de estas células, de forma que se solventó el problema de la división celular (White SM. 2004).

En la actualidad se está trabajando con distintos tipos de líneas celulares cardiomiocitarias. Así, se está utilizando la línea celular H9c2 (Ekhterae D et al. 1999, Van Der Lee KA et al. 2000) que procede de células derivadas de corazones embrionarios de rata; la línea P19CL6 (Monzen K et al. 1999), la cual es un sistema de diferenciación de cardiomiocitos *in vitro*, derivada de la línea celular P19 (Davidson SM et al. 2000) obtenida de teratocarcinoma embrionario; la línea AT-1 (Shahrara S et al. 1997), que son células derivadas de tumores atriales de ratones transgénicos; y la línea HL-1 que es a su vez derivada de la AT-1 (Claycomb WC et al. 1998). Esta última línea celular, HL-1, presenta la ventaja frente a las otras líneas, incluida la línea AT-1 de la que deriva, que además de dividirse continuamente, es capaz de mantener el fenotipo de un cardiomiocito adulto a través de indefinidos pasajes en cultivo (Claycomb WC et al. 1998). Además, estas células se pueden mantener almacenadas en nitrógeno líquido, y posteriormente pueden ser descongeladas sin que varíe su fenotipo.

Como ejemplo de obtención de líneas celulares cardiomiocitarias tenemos los trabajos realizados en 1999 por el grupo de Ogawa S (Makino S et al. 1999), en los que se consiguió obtener una línea celular a partir de células del estroma de la médula ósea. La idea surgió del hecho de que partiendo de fibroblastos 10T1/2 cultivados, se obtuvieron células de músculo esquelético por diferenciación de los fibroblastos, simplemente mediante la alteración de la expresión de un número muy pequeño de genes. Siguiendo con esta línea de investigación, lo que se pensó es que las células del estroma de la médula ósea por sus características podrían ser

capaces de diferenciarse en precursores de cardiomiocitos. A continuación las células del estroma fueron immortalizadas mediante un prolongado cultivo *in vitro*, aproximadamente cuatro meses, y a partir de ellas se identificó un clon de células adherentes como los fibroblastos, que tras ser tratados con 5-azacitidina se diferenciaban en miocitos capaces de contraerse. A estas células se las pasó a conocer como células cardiomiogénicas (CMG). Tras la diferenciación, estas células, adquirieron rasgos morfológicos de las células cardíacas, incluyendo sarcómeras, de uno a tres núcleos localizados centralmente, etc. El hecho de que las células CMG se puedan diferenciar eficientemente en cardiomiocitos tras el tratamiento con 5-azacitidina, sugiere que la diferenciación de los miocitos cardíacos está controlada por un número muy pequeño de genes y vías de señalización. Estos hallazgos pueden enfocarse hacia el desarrollo de terapias de sustitución o reemplazamiento celular para tratar una amplia variedad de cardiomiopatías mediante inyección de estas células en el miocardio. Estudios recientes, realizados por distintos grupos, han sugerido que cardiomiocitos embrionarios pueden ser inyectados en el miocardio ventricular adulto donde se incorporan de forma estable al músculo cardíaco. Los hallazgos de Ogawa S et al., sugieren la posibilidad de utilizar las células del estroma de la médula ósea para la generación de músculo cardíaco nuevo. También se ha planteado la posibilidad de ser utilizadas para realizar modificaciones genéticas en ellas y posteriormente utilizarlas en terapias de reemplazamiento (Davis RS et al. 1987, Olson EN et al. 1994).

### **3. La hipertrofia cardíaca**

La hipertrofia cardíaca se puede clasificar en fisiológica y en patológica. Los cambios moleculares, bioquímicos, y fisiológicos asociados con la hipertrofia fisiológica difieren de forma tanto cualitativa como cuantitativa de los cambios que ocurren durante la hipertrofia patológica. Así, una sobrecarga de presión y volumen, infarto de miocardio, mutación de proteínas sarcoméricas, o desajuste hormonal, puede conducir al desarrollo de una hipertrofia patológica crónica mediante la inducción de genes tempranos inmediatos, activación de un programa genético embrionario y reorganización de la arquitectura del citoesqueleto del miocito (Komuro I & Yazaki Y. 1993). Son varias las patologías cardíacas que acompañan al

crecimiento hipertrófico, entre las cuales están isquemia, hipertensión, insuficiencia cardíaca y enfermedad valvular (Frey N et al. 2004). Entonces, la hipertrofia patológica se da como respuesta adaptativa del corazón a un incremento anormal en el trabajo de éste, ya sea de forma general o regional (Figura 3). En un principio, el aumento en la masa cardíaca sirve para normalizar el estrés que sufre la pared cardíaca y permitir así una función cardiovascular normal al resto del órgano, y durante el ejercicio en la hipertrofia compensada. Si el estímulo para la hipertrofia patológica es lo suficientemente prolongado o intenso, entonces a éste le sucederá una hipertrofia descompensada y posteriormente insuficiencia cardíaca (Haunter JJ & Chien KR. 1999).

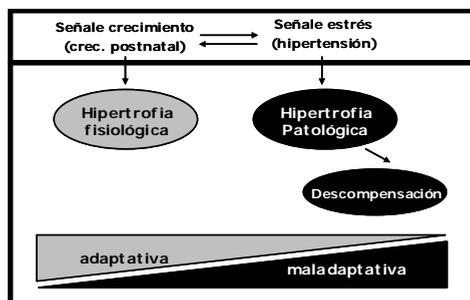


Figura 3. Desarrollo y consecuencias de la hipertrofia fisiológica y patológica.

El desarrollo de la hipertrofia cardíaca tiene claros efectos a nivel celular sobre el miocito. Así, la hipertrofia del cardiomiocito se caracteriza en un primer momento por un aumento en el tamaño celular, síntesis proteica, y organización sarcomérica (Frey N et al. 2004). A este nivel, y de forma clásica se diferencian dos tipos de fenotipos hipertróficos: hipertrofia concéntrica e hipertrofia excéntrica. El primer caso se debe a una sobrecarga de presión y se caracteriza por la adición lateral de sarcómeras, y el crecimiento lateral de los cardiomiocitos. El segundo caso se debe a una sobrecarga de volumen o previo a un infarto, y se caracteriza por la adición de sarcómeras en serie y el crecimiento longitudinal de los cardiomiocitos (Frey N et al. 2004). Dichos cambios fenotípicos son el reflejo de la expresión de un programa genético embrionario, ya que esta expresión génica es característica de las etapas de desarrollo embrionario. Este programa genético incluye la expresión génica de los péptidos natriuréticos

ANP y BNP, y la expresión de proteínas contráctiles como la isoforma  $\beta$  de la cadena pesada de la miosina ( $\beta$ -MHC), y la isoforma  $\alpha$  de la actina de músculo esquelético, características del desarrollo embrionario (Dorn GW et al. 2003).

#### 4. Implicaciones de la matriz extracelular sobre la funcionalidad del cardiomiocito

Las células cardíacas se sustentan sobre una complicada red de proteínas que es la matriz extracelular (ECM). Aunque los cardiomiocitos ocupan la mayor parte de la masa cardíaca por volumen, están incluidos en una extensa red extracelular de colágeno y otras proteínas estructurales, incluyendo fibronectinas y proteoglicanos. El conjunto de todas estas proteínas forman una estructura extracelular e intracelular que es un determinante crítico de la forma cardíaca durante el crecimiento cardíaco normal y patológico (Weber KT et al. 1991). Los fibroblastos cardíacos son importantes en la producción y mantenimiento de la matriz extracelular del corazón. La proliferación anormal de los fibroblastos y la deposición de proteínas de la matriz extracelular, principalmente colágeno, puede afectar de modo negativo a la función del corazón (Booz GW & Baker KM. 1995). Una excesiva deposición de la matriz extracelular cardíaca se asocia a una sobrecarga mecánica fisiopatológica del corazón (Figura 4) (MacKenna D et al. 2000).



**Figura 4. Implicaciones de la matriz extracelular en la formación y funcionalidad del corazón.**

Diversas patologías cardíacas, tales como hipertensión, insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio, tienen en común un proceso de remodelado miocárdico, responsable final de la muerte en estas enfermedades. El remodelado miocárdico es un proceso dinámico en el que se dan una serie de cambios estructurales en los que se ven involucrados tanto miocitos como no miocitos. La deposición de la matriz de colágeno, principal componente de la matriz extracelular, por parte de los fibroblastos, permite el mantenimiento de la estructura y función

cardíacas. Una excesiva deposición de colágeno o fibrosis patológica durante el proceso de remodelado, contribuye a la disfunción ventricular izquierda y a la progresión de patologías como hipertensión, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca (Jugdutt BI. 2003).

La unión de los cardiomiocitos a la matriz extracelular está mediada por integrinas. Las integrinas son unas proteínas situadas en la membrana celular que presentan dos dominios, uno extracelular y otro citoplasmático. El dominio extracelular se une a la fibronectina de la matriz extracelular, mientras que el dominio citoplasmático está asociado con una proteína tirosina quinasa formando las llamadas adhesiones focales. Esta proteína tirosina quinasa es la denominada quinasa de adhesión focal (FAK), la cual media una gran parte de las respuestas iniciadas en las adhesiones focales. El conjunto de estas proteínas participan en una vía molecular capaz de ser activada de forma diferencial por isquemia, extensión mecánica y estrés oxidativo del miocardio, y proporciona un mecanismo adicional para el crecimiento alterado en presencia de condiciones patológicas (Laser M et al. 2000, Torsoni AS et al. 2003). La importancia de la matriz extracelular en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, ha sido constatada en distintos estudios en los que se han utilizado agonistas capaces de inducir hipertrofia. Es el caso de la fenilefrina (PE), utilizada para inducir hipertrofia en cardiomiocitos neonatales ventriculares (Taylor JM et al. 2000). Se ha comprobado que señales que provienen de las proteínas de la matriz extracelular aumentan la respuesta hipertrófica de las células del miocardio, y proporcionan evidencias de que la señalización dependiente de estas proteínas es mediada, en parte, por las quinasas de adhesión focal (FAK). La adición de PE a los cardiomiocitos en cultivo sobre proteínas como laminina y fibronectina, estimula los principales rasgos característicos de la hipertrofia patológica (Taylor JM et al. 2000), tales como reorganización sarcomérica, incrementa el tamaño celular, e inducción de la expresión del péptido atrial natriurético (ANP) (Chien KR et al. 1993). En contraste a ésta observaciones, los cardiomiocitos cultivados sobre sustratos no adhesivos como gelatina, exhibieron una reducida capacidad para llevar a cabo los cambios hipertróficos inducidos por PE. El cultivo de las células sobre laminina o fibronectina, que son proteínas de la matriz dependientes de integrinas, supuso una respuesta hipertrófica al tratar con PE, mientras que células cultivadas sobre

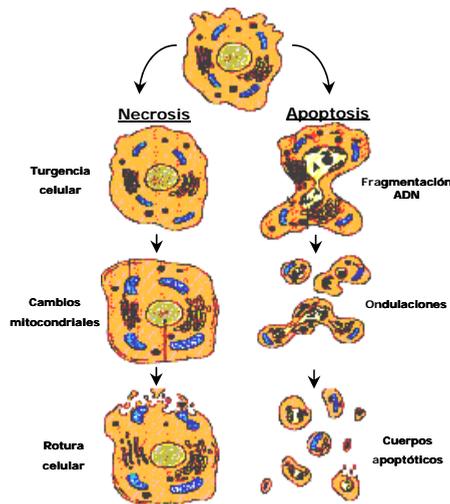
substrato no dependiente de integrinas, como la gelatina, fallaron en el mantenimiento de la hipertrofia celular (Taylor JM et al. 2000). En otros estudios y contrariamente a lo dicho, se ha comprobado que los cardiomiocitos sembrados sobre gelatina mostraron respuesta hipertrófica inducida por agonistas (Sah VP et al. 1996, Hoshijima M et al. 1998). Es posible que en este caso influyeran otros factores como la elevada densidad del cultivo y la prolongada duración del tratamiento, de forma que el resultado final de estos experimentos llevase a modificaciones en el entorno de las proteínas de la matriz extracelular por los miocitos durante el cultivo, permitiendo así el mantenimiento del crecimiento hipertrófico (Taylor JM et al. 2000).

Es tal la importancia de la matriz extracelular para el desarrollo de los cardiomiocitos que se ha llegado a desarrollar un protocolo de cultivo celular sobre una matriz extracelular natural denominada cardiogel. Este substrato es sintetizado por los propios fibroblastos cardíacos, y contiene las proteínas típicas de la matriz como laminina, fibronectina, colágeno y proteoglicanos. La comparación de cardiomiocitos cultivados sobre cardiogel con miocitos cultivados sobre lamina o fibronectina solas, mostró que los primeros se adherían mucho más rápidamente tras la siembra, exhibían contracciones espontáneas tempranas, presentaban un mayor área y volumen, sufrían diferenciación del citoesqueleto y miofibrilar más temprana, y un crecimiento más largo que las otras. Ésto sugiere que el crecimiento celular refleja el efecto sinérgico de numerosas señales de componentes de la matriz extracelular que en cardiogel, son transducidas por los elementos del citoesqueleto de los cardiomiocitos (VanWinkle WB et al. 1996).

## **5. Muerte celular y cardiomiocitos: la apoptosis**

La muerte celular se puede dividir en dos grupos con características morfológicas y dinámicas distintas (Colucci WS. 1996, Haunstetter A & Izumo S. 1998, Díez J. 2000): necrosis y apoptosis. La necrosis representa el conjunto de cambios degradativos en los que culmina cualquier tipo de muerte celular. Por tanto, a la necrosis se puede llegar tanto por apoptosis como por oncosis (la célula se hincha y estalla) (Díez J. 2000). Una diferencia fundamental entre apoptosis y necrosis, es que la apoptosis es un proceso dependiente de ATP que necesita una actividad metabólica residual por parte de la célula (Clerk A et al. 2003). Pero la diferencia

básica a nivel patológico entre apoptosis y necrosis aparece en que la destrucción de la célula por necrosis es debida a estímulos externos, mientras que en la apoptosis la célula se destruye a sí misma en respuesta a condiciones desfavorables. Esto tendrá como consecuencia unos rasgos morfológicos, bioquímicos, y diagnósticos diferentes (Haunstetter A & Izumo S. 2001) (Figura 5).



**Figura 5. Diferencias básicas entre necrosis y apoptosis.**

Una célula puede sufrir apoptosis en respuesta a estímulos que pueden ser muy diversos, por ejemplo, ligandos para receptor de muerte, como es el caso de las citoquinas, agentes que dañan el ADN, pro-oxidantes, etc., pero todos en una vía de señalización de muerte autónoma (Haunstetter A & Izumo S. 1998). El mecanismo final común para este proceso es la activación de un subgrupo de proteasas que son las caspasas. Estas proteasas, una vez activadas, rompen proteínas celulares, lo que conduce a alteraciones morfológicas que son características de las células que están muriendo. En la apoptosis típica, la cromatina nuclear se condensa, el núcleo se encoge y se rompe en pequeños fragmentos subnucleares. El ADN genómico se rompe entre los nucleosomas, donde normalmente está enrollado alrededor de los complejos formados por las histonas. Cuando la apoptosis es avanzada, la célula pierde volumen y en la membrana aparecen ondulaciones que pueden contener orgánulos celulares como las

mitocondrias en el caso de los cardiomiocitos, y por último estas ondulaciones se acaban rompiendo para dar lugar a los llamados cuerpos apoptóticos (Colucci WS. 1996, Haunstetter A & Izumo S. 2001).

### **5.1. Apoptosis cardiomiocitaria**

La apoptosis cardiomiocitaria es un proceso que va a afectar de modo muy importante multitud de aspectos de la biología del corazón (Thompson CB. 1995, Vaux DL et al. 1996, Garg S et al. 2005). Hasta no hace mucho se creía que los cardiomiocitos eran células totalmente diferenciadas sin capacidad para replicarse o sufrir apoptosis. Recientemente se ha demostrado que esto no es así, y estas células pueden sufrir ambos procesos (Anversa P & Kajstura J. 1998). Esto ha despertado gran interés dentro de la cardiología, principalmente por dos razones: la primera es que la apoptosis aparece en estudios patológicos y experimentales como una característica común a muchas de las enfermedades cardíacas, incluyendo isquemia e insuficiencia cardíaca, además de estar implicada en la progresión de dichas patologías (Haunstetter A & Izumo S. 2000, Kang PM & Izumo S. 2000, Garg S et al. 2005); la segunda razón es que la apoptosis es una forma de muerte celular regulada que podría proporcionar nuevos enfoques a la hora de desarrollar una terapia para prevenir la pérdida de cardiomiocitos, y además prevenir o ralentizar la progresión de distintas patologías cardíacas (Haunstetter A & Izumo S. 2000). En los últimos años se pensaba que la pérdida de miocitos se debía exclusivamente a necrosis, pero actualmente existen evidencias de la existencia de muerte cardiomiocitaria por apoptosis, por ejemplo durante la progresión de la insuficiencia cardíaca (Garg S et al. 2005). Son muchos los modelos de insuficiencia cardíaca que presentan apoptosis en respuesta a estímulos como isquemia, isquemia-reperusión, hipoxia, exceso de calcio, estrés oxidativo, etc. Curiosamente, el fenómeno de la apoptosis aparece presente a lo largo de la evolución de la insuficiencia cardíaca, tanto en eventos iniciales (isquemia, infarto, inflamación), como en tardíos, cuando aparece disfunción ventricular izquierda (Garg S et al. 2005). Por tanto, no es de extrañar que muchos de los esfuerzos terapéuticos estén encaminados hacia la prevención e inhibición de este proceso.

Desde el punto de vista de la arquitectura celular, la apoptosis equilibra el efecto de la proliferación celular. Es un proceso muy importante durante el desarrollo postnatal del corazón, ya que desempeña un papel relevante en la configuración morfológica del órgano (James TN. 1994). Como ejemplo, se ha determinado que este proceso es diferente entre los ventrículos del corazón neonatal y que determina la capacidad contráctil de éstos en etapas posteriores. Por esto, alteraciones que se puedan dar en la regulación de la apoptosis pueden desembocar en el desarrollo de numerosas patologías. Así, una apoptosis exagerada puede conducir a la atrofia y fallo de la función de un órgano, por otro lado una apoptosis insuficiente propicia la remodelación del órgano, y puede conducir al desarrollo de procesos tumorales e inmunoinflamatorios (Díez J. 2000).

La apoptosis está controlada por programas genéticos, que pueden ser activados por un amplio rango de eventos fisiológicos y patológicos (Colucci WS. 1996). Así, se ha identificado una familia de proteínas implicadas en la regulación del proceso apoptótico. Estas proteínas se conocen con el nombre de Proteínas de la Familia Bcl-2. La expresión del oncogén *bcl-2* deriva en la síntesis de la proteína Bcl-2, capaz de bloquear la muerte celular por apoptosis (Hockenbery D et al. 1990). Dentro de esta familia se han identificado más de 10 proteínas con características anti-apoptóticas, como Bcl-2, y pro-apoptóticas, como Bax (Adams JM & Cory S. 1998). Se ha demostrado que la expresión del gen *bcl-2* en cardiomiocitos está disminuida en estados fisiopatológicos asociados con una tensión incrementada de los miocitos *in vitro* o con el miocardio isquémico *in vivo*. También se ha comprobado que, bajo condiciones similares, la expresión del gen *bax* está aumentada (Condorelli G et al. 1999). Por tanto la relación de la expresión entre *bcl-2* y *bax*, se puede considerar como un importante marcador de la supervivencia de las células del miocardio.

Una característica común que presentan las enfermedades que llevan a la muerte del cardiomiocito es la elevada concentración de citoquinas en la sangre o en el propio músculo cardíaco. Esto normalmente se asocia con una depresión en la función cardíaca y con apoptosis (Pulkki KJ. 1997). Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular producidas por varios tipos celulares, particularmente células inflamatorias. Estas proteínas se unen a receptores

específicos e inducen expresión génica en las células diana. A nivel cardíaco podemos dividir las en tres categorías diferentes, a) pro-inflamatorias, b) anti-inflamatorias y c) cardioprotectoras. Las citoquinas pro-inflamatorias, como por ejemplo TNF- $\alpha$ , pueden inducir muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis, y se expresan de forma rápida en distintas cardiopatías, en particular en insuficiencia cardíaca (Paulus WJ. 2000). Las anti-inflamatorias, como por ejemplo IL-10, son capaces de inhibir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (Pulkki KJ. 1997), y se ha observado que, al contrario de las pro-inflamatorias, éstas no se ven aumentadas en insuficiencia cardíaca, produciéndose así un desequilibrio en el conjunto de citoquinas (Aukrust P et al. 2005). Por su parte, el grupo de citoquinas cardioprotectoras hace referencia a aquellas citoquinas que presentan efectos beneficiosos a nivel cardíaco. Este el caso por ejemplo de IL-1 (Maulik N et al. 1993) e IL-2 (Cao CM et al. 2004), las cuales reducen el daño miocárdico por isquemia reperfusión, o incluso de TNF- $\alpha$ , el cual es cardioprotector en exposiciones breves (Tanno M et al. 2003).

## **6. Regulación hormonal a nivel cardíaco**

Son numerosas las hormonas que tienen como diana de su acción al corazón. Esto quiere decir que parte de las funciones fisiológicas que desempeña este órgano van a estar reguladas por una respuesta hormonal. Por el contrario el corazón, como órgano endocrino que es, contribuye a la homeostasis corporal a través de la secreción de un número de hormonas peptídicas con actividad biológica capaces de actuar sobre distintos tejidos diana (Durocher D et al. 1998). Por tanto, el conjunto de señales hormonales que se integran en el corazón regulando algunas de las funciones biológicas del mismo, se podrían clasificar en señales endocrinas, y señales autocrinas. Las primeras estarían mediadas por aquellas hormonas procedentes de la circulación que actúan a nivel cardíaco, y las segundas se deberían a la acción de las hormonas secretadas por el corazón capaces de actuar sobre el propio órgano. Entre todo este conjunto de hormonas cabe destacar:

### **6.1. Péptidos natriuréticos**

A este grupo pertenecen tres hormonas, el péptido natriurético atrial (ANP), el péptido natriurético cerebral o tipo B (BNP), y el péptido natriurético tipo C (CNP). De estas tres

hormonas las más importantes son ANP y BNP. Estas dos hormonas se sintetizan principalmente en cardiomiocitos de aurícula y ventrículo, respectivamente, de donde son liberadas a la circulación en respuesta a estiramiento de los mismos (Woods RL. 2004). Las principales acciones endocrinas conocidas de ANP y BNP circulantes son: estimulación de la natriuresis y diuresis renal, inhibición de la liberación y/o acción de otros sistemas de hormonas presoras como el sistema renina-angiotensina-aldosterona, etc., disminución del volumen de sangre circulante mediante secuestro de plasma, y efecto vasodilatador a grandes dosis o en insuficiencia cardíaca.

Además de estas acciones endocrinas, ANP y BNP presentan funciones autocrinas y paracrinas sobre el corazón y la circulación coronaria. Estas funciones incluirían regulación del crecimiento de los miocitos, inhibición de la proliferación de fibroblastos, y por tanto de la deposición de matriz extracelular, efecto citoprotector frente a isquemia, y acción sobre el endotelio coronario y la proliferación y contractilidad del músculo liso vascular (D'Souza et al. 2004).

Las distintas acciones biológicas de los péptidos están mediados por la unión a receptores guanilil ciclasa asociados a membrana (NPRs). Existen tres subtipos de receptores con distinta afinidad por los péptidos, NPR-A, NPR-B y NPR-C. Los dos primeros median las principales acciones fisiológicas de los péptidos natriuréticos, mientras que el NPR-C participa en la eliminación de éstos de la circulación (Baxter GF. 2004).

## **6.2. Aldosterona**

Se trata del mineralocorticoide de mayor importancia fisiológica. Su principal función es actuar sobre el transporte de electrolitos a través del epitelio, particularmente del riñón. Incrementa la reabsorción de sodio, y por tanto de agua, y la secreción de potasio actuando sobre sus canales (White PC. 2003). Varias evidencias muestran que la aldosterona tiene efectos negativos a nivel cardíaco. Así, un exceso de aldosterona (aldosteronismo primario) tiene como resultado causar hipertensión, la cual a su vez, tiene efectos negativos sobre el sistema cardiovascular como la hipertrofia ventricular izquierda y fibrosis cardíaca (White PC. 2003). Esto indica que la aldosterona afecta directamente al crecimiento de los cardiomiocitos. Se ha

comprobado que la aldosterona aumenta los niveles de calcio intracelular lo que podría desencadenar hipertrofia cardíaca (Benitah JP & Vassort G. 1999), a través de la expresión de calcineurina, una fosfatasa calcio/calmodulina dependiente capaz de causar hipertrofia. Por otro lado, la aldosterona tiene efectos en estados patológicos del sistema cardiovascular como infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca. Se ha comprobado que la aldosterona sintasa, enzima sintetizadora de aldosterona, y la propia aldosterona se sintetizan por el corazón bajo estas condiciones patológicas (White PC. 2003). Las intervenciones terapéuticas frente a los efectos negativos de la aldosterona pasan principalmente por el antagonismo del receptor de mineralocorticoides.

### **6.3. Adrenomedulina**

Hormona implicada en la regulación de la homeostasis cardiovascular y de la relación presión/volumen, así como en la patofisiología de la enfermedad cardíaca. Su expresión se detecta en distintos tejidos, muchos de ellos implicados en la regulación de presión y volumen. Esta hormona actúa a través de receptores acoplados a proteínas G. En cuanto al corazón, su presencia es elevada en las aurículas y baja en los ventrículos (Rademaker MT et al. 2003). La principal fuente de la adrenomedulina circulante en plasma es el tejido vascular, en condiciones no patológicas. Se ha visto que los niveles de esta hormona están aumentados en insuficiencia cardíaca. Así, las concentraciones de adrenomedulina circulante están elevadas en enfermedad cardiovascular, de forma proporcional a la importancia del daño cardíaco y hemodinámico (Rademaker MT et al. 2003).

Algunas de las principales acciones biológicas de adrenomedulina, implicadas en insuficiencia cardíaca, incluyen dilatación de vasos que presentan resistencia e incremento del flujo sanguíneo coronario, efectos cardíacos ionotrópicos positivos, desensibilización del reflejo barorreceptor e inhibición de las acciones vasoconstrictoras de angiotensina II y endotelina-1 (Samson WK. 1999). Además, es capaz de inhibir la hipertrofia de los cardiomiocitos (Tsuruda T et al. 1998).

#### **6.4. Leptina**

La importancia de la leptina a nivel cardiovascular viene dada por la relación entre la hormona, la hiperleptinemia y la función cardiovascular; que va a condicionar la patogénesis de las disfunciones cardiovasculares ligadas a la obesidad (Ren J. 2004). La obesidad es un estado de hiperleptinemia en el que se evidencia una resistencia a la leptina.

Datos clínicos sugieren que la leptina podría intervenir en insuficiencia cardíaca mediante su participación en la caquexia cardíaca catabólica. Así, los niveles plasmáticos de la hormona en pacientes con infarto de miocardio están asociados con el daño cardíaco desarrollado (Fujimaki S et al. 2001), y en pacientes con insuficiencia cardíaca se presentaron elevados (Schulze PC et al. 2003). Por otro lado, la leptina también tiene efectos sobre la función vascular y la presión sanguínea. Se ha comprobado como la leptina induce relajación vascular a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de óxido nítrico (ON), y que la administración en distintos ensayos de leptina intracerebroventricular o intravenosa, aumentó la presión sanguínea arterial. Sin embargo, también se ha mostrado que la administración aguda de leptina no tuvo estos efectos hipertensivos (Ren J. 2004). Estos resultados indicarían la complejidad de los mecanismos de acción de la leptina. Por otro lado, se ha demostrado también que el tratamiento crónico con leptina aumenta la frecuencia cardíaca, y que en individuos hiperleptinémicos esta frecuencia elevada predispone a cambios fisiopatológicos que podrían derivar en insuficiencia cardíaca congestiva e infarto de miocardio (Ren J. 2004).

A nivel cardiomiocitario, leptina tiene efectos ionotrópicos negativos sobre la contracción y liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular de los cardiomiocitos (Nickola MW et al. 2000).

#### **6.5. Ghrelina**

Los efectos de ghrelina sobre el sistema cardiovascular son claramente beneficiosos. Se ha contrastado que ejerce efectos directos vasodilatadores, que disminuye la media de la presión sanguínea arterial, y que la infusión intravenosa de la hormona tiene efectos hemodinámicos positivos en pacientes con insuficiencia cardíaca (Nagaya N & Kangawa K. 2003). También se ha demostrado que la hormona inhibe la apoptosis de distintos tipos celulares como células

endoteliales y cardiomiocitos. En concreto, se ha demostrado que los cardiomiocitos sintetizan y secretan la hormona, y que ésta ejerce un papel protector frente a la apoptosis cardiomiocitaria (Iglesias MJ et al. 2003). Otro de los efectos positivos del péptido a nivel cardiovascular vendría dado por la protección que ejerce frente a daño cardiovascular por isquemia-reperusión (Sharma V & McNeill JH. 2005). La administración de ghrelina a ratas con insuficiencia cardíaca llevó consigo una mejora de la función cardíaca, mediada por los efectos vasodilatadores y anti-apoptóticos de la hormona (Nagaya N & Kangawa K. 2003).

Por otro lado, es común que pacientes en estados tardíos de insuficiencia cardíaca presenten caquexia cardíaca, un estado catabólico que se caracteriza por la pérdida de peso y masa muscular. Esto hace de la caquexia cardíaca una diana terapéutica en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Se ha postulado que la ghrelina puede ser un tratamiento potencial de la caquexia cardíaca gracias a sus efectos directos promoviendo la ingesta de comida y adiposidad, así como el crecimiento muscular a través del eje GH/IGF-1 (Sharma V & McNeill JH. 2005).



## **INTRODUCCIÓN HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)**



## 1. Estructura y localización

La hormona de crecimiento (GH) es un péptido de 191 aminoácidos con un peso molecular de 22 kDa, formado por una cadena sencilla (Figura 1). Comparte una marcada homología estructural con el lactógeno placentario humano y prolactina (Kopchick JJ & Andry JM. 2000). El gen codificante de esta hormona en humanos está localizado en el brazo largo del cromosoma 17

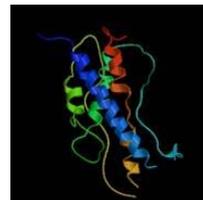


Figura 1. Estructura de la GH humana.

(17q23). Este gen contiene 5 exones codificantes para una proteína precursora de 217 aminoácidos. La rotura de una secuencia de 26 aminoácidos da lugar a la proteína madura. Aproximadamente el 85% de la GH circulante se corresponde con esta forma de la proteína (191 aas) (Salvatori R. 2004). Aparte de esta forma de 22 kDa, se ha identificado otra forma con un peso molecular de 20 kDa, la cual procede del mismo gen que la variante de 22 kDa, pero de un ARNm diferente. Difiere de la forma de 22 kDa en que presenta la pérdida de una serie de residuos aminoacídicos (Baumann G. 1991).

## 2. Producción y secreción

La secreción pulsátil de GH está regulada por un complejo sistema de control neuroendocrino, en el que interviene dos neuropéptidos hipotalámicos, somatostatina u hormona liberadora de GH (GHRH), y somatostatina (SS). GHRH ejerce efectos estimuladores de la secreción de GH sobre las células somatotropas (células acidófilas secretoras de GH), mientras que el efecto de SS es inhibitorio (Figura 2). Ambos péptidos son los últimos mediadores de las influencias metabólicas, endocrinas, neurales e inmunológicas sobre la secreción de GH por la hipófisis (Muller EE et al. 1999).

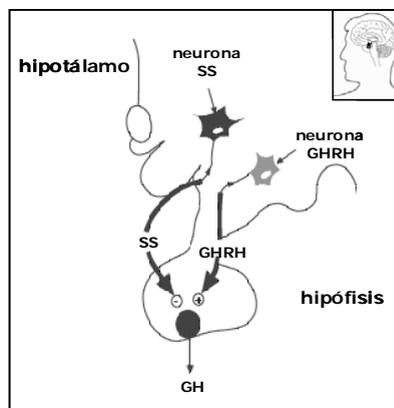


Figura 2. Regulación de la secreción de GH por el eje Hipotalamo/Hipofisario.

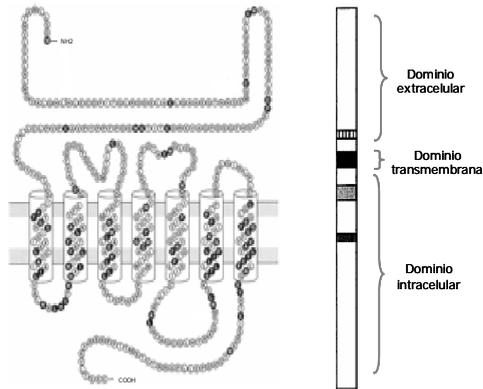
La GH se almacena dentro de gránulos secretores en las células somatotropas, y se libera en respuesta a un aumento en las concentraciones intracelulares de AMPc y/o  $Ca^{2+}$  por acción de GHRH (Kopchick JJ & Andry JM. 2000). En este proceso regulador de la secreción de GH también interviene un factor de transcripción específico de la hipófisis denominado Pit-1. La producción de AMPc por parte de las células somatotropas aumenta las concentraciones de Pit-1, de forma que éste se une a sitios específicos en el gen de la hormona de crecimiento (Kopchick JJ & Andry JM. 2000). Existe otro tipo de moléculas sintéticas denominadas péptidos liberadores de GH (GHRPs) capaces de estimular la liberación de GH. Estas moléculas estimulan la secreción de GH a través de la activación del receptor de secretagogos de GH (GHS-R) (Kopchick JJ & Andry JM. 2000), al cual se une la hormona ghrelina anteriormente citada.

### **3. Receptor de GH y proteínas transportadoras de GH (GHBP)**

La hormona de crecimiento se une con alta afinidad y especificidad a dos proteínas, el receptor de GH (GHR) y la proteína de unión a la GH (GHBP). El receptor está presente en la membrana celular de los tejidos diana de la hormona, donde ésta ejercerá sus efectos somatogénicos y metabólicos (Edens A & Talamantes F. 1998). El receptor de GH pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas de clase 1, entre los que también están el receptor de prolactina, factor neurotrófico ciliar (CNTF), leptina, etc (Zhu T et al. 2001). Por su parte, la GHBP se encuentra circulando en suero y es capaz de formar complejos con la GH circulante.

El receptor de GH es una proteína con un dominio transmembrana de unos 620 aminoácidos, dependiendo de la especie. La estructura del GHR consiste en un dominio extracelular de unión a la hormona en el extremo N-terminal. Este dominio comprende unos 245 aminoácidos, según la especie. Presenta también un dominio hidrofóbico transmembrana de 24 aminoácidos, y un dominio de señalización intracelular de unos 350 aminoácidos. El peso molecular esperado para el receptor oscila entre 100-130 kDa según la especie, aunque también se han encontrado tamaños mayores y menores (Edens A & Talamantes F. 1998) (Figura 3).

La expresión del receptor de GH se determinó en un principio en el hígado, lo que hizo pensar que era específico de este tejido. Posteriormente, se comprobó que también se expresa en

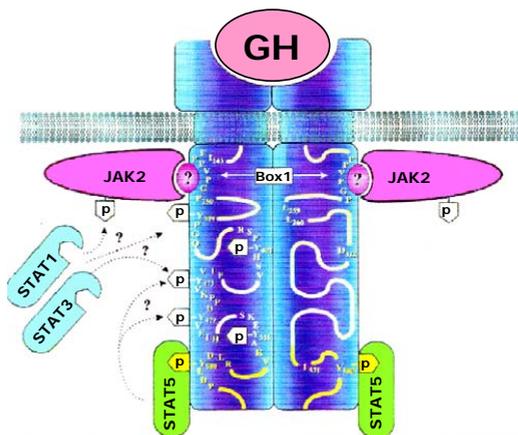


**Figura 3. Estructura del receptor de GH. Pertenecer a la superfamilia de receptores de citoquinas de clase 1, y presenta 7 dominios transmembrana.**

otros tejidos, como es el caso de músculo, tejido adiposo, glándula mamaria, hueso, riñón y células embrionarias (Kelly PA et al. 1991). La presencia del receptor ha sido encontrada también en el cerebro, lo que suponía que la GH debía de cruzar la barrera hematoencefálica para ejercer sus efectos (Nyberg F &

Burman P. 1996). Se han encontrado sitios de unión en células B humanas, en linfocitos IM-9, y en células de epitelio de timo cultivadas (Ban E et al. 1991, Rapaport R et al. 1995). Asimismo, se ha determinado su expresión génica en células de diversos tejidos inmunológicos como células T, células B, y timocitos de tejidos humanos y de ratón (Hull KL et al. 1996) (revisado en Kopchick JJ & Andry JM. 2000). En el corazón, los niveles de expresión del receptor de GH son elevados, siendo tras el hígado uno de los órganos de mayor expresión (Fazio S et al. 2000).

La GH se une al dominio extracelular de dos moléculas de receptor, lo que deriva en la homodimerización del mismo (Zhu T et al. 2001). Es un proceso secuencial que ocurre en dos fases: en la primera, la GH se une a un sitio de alta afinidad dentro del primer receptor, y en la segunda, se une a un sitio de baja afinidad en el segundo receptor, lo que supone la dimerización de éste. La formación del complejo hormona-receptor, va a desencadenar una respuesta biológica a través de varias vías de señalización (Figura 4). La interacción GH/GHR deriva en primer lugar en la activación de la tirosina quinasa JAK2, perteneciente a la familia de las Janus quinasa, mediante fosforilación y activación catalítica del dominio quinasa (Zhu T et al. 2001). La activación de JAK2 supone la fosforilación por parte de ésta del receptor de GH, lo que dará lugar a la aparición de sitios de anclaje para una amplia variedad de moléculas. Entre estas moléculas están las STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription), la proteína homóloga a colágeno Src, y los sustratos 1 y 2 del receptor de insulina (IRS-1 y -2). La



**Figura 4. La unión de la hormona al receptor induce la dimerización de éste y la activación mediante fosforilación de las proteínas JAK2 y STAT5.**

principal vía de señalización de GH ocurre a través de las proteínas STAT, más concretamente de STAT5, aunque GH también es capaz de activar la vía de MAP quinasa (Zhu T. 2001).

La GHBP es la forma soluble circulante del receptor de GH. Existen dos tipos de proteínas de unión a la GH en función de su afinidad a esta. Estas serán proteínas de alta afinidad o proteínas de baja afinidad.

Las proteínas de baja afinidad se han encontrado en el plasma de humanos y animales, y son capaces de unir una pequeña proporción de la GH circulante (Baumann G et al. 1989). Se une de forma algo más preferente a la forma de GH de 20 kDa. Por su parte, las proteínas de elevada afinidad se han encontrado en la sangre de todas las especies examinadas y se han conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados (Baumann G. 2001). Presentan una gran homología con el receptor de GH, y se generan a través de dos mecanismos distintos. Mediante proteólisis del dominio extracelular del receptor de GH o por *splicing* alternativo del transcripto primario del receptor. Ambos mecanismos van a dar lugar a GHBP con un dominio de unión a la GH exactamente igual que el del receptor. La generación de GHBP por uno u otro mecanismo va a depender de la especie (Edens A & Talamantes F. 1998). En humanos y conejo el mecanismo utilizado es la proteólisis del receptor, mientras que en ratón y rata es el *splicing* alternativo del transcripto (Baumann G. 2001).

Parece que la función principal de las proteínas de unión a la GH es la de formar complejos con la GH, uniendo el 50% de la GH circulante. De esta forma las GHBP estarían regulando los niveles de GH libre que circula en la sangre, ya que el complejo que forman con la GH constituiría un reservorio de la hormona. Este hecho permite prolongar la vida media de

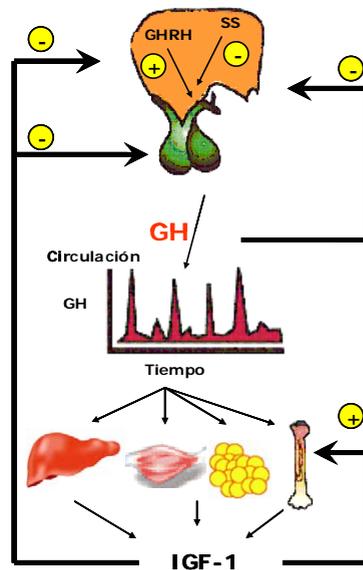
la GH en plasma. También, mediante la formación de los complejos, estarían modulando la acción de la GH a nivel celular (Baumann G. 2001).

#### 4. Efectos de la GH

Los efectos biológicos directos de la GH están mediados por la unión a su receptor en los tejidos diana. Sin embargo muchos de los efectos biológicos de la hormona, como promover el crecimiento, son ejercidos de forma indirecta a través de la estimulación de la producción de IGF-1 en el hígado (acción endocrina) y en tejidos periféricos (acción autocrina/paracrina) (Colao A et al. 2004). La vida media en suero de IGF-1 es más larga que la de GH por lo que IGF-1 facilita el crecimiento de tejidos en colaboración con GH y otros factores de crecimiento (Volterrani M et al. 2000) (Figura 5).

El principal efecto de la GH es promover el crecimiento postnatal longitudinal. Esta acción promotora se debe a efectos pleiotrópicos de la hormona sobre el metabolismo y la diferenciación celular. Así, la GH regula el metabolismo de lípidos, carbohidratos, nitrógeno y minerales dentro de la célula (Kopchick JJ & Andry JM. 2000). La GH ejerce dos acciones opuestas sobre el metabolismo de carbohidratos. En primer lugar ejerce efectos similares a los de insulina que incluyen lipogénesis y estimulación del metabolismo de glucosa y aminoácidos

(Casanueva FF. 1992). En segundo lugar presenta efectos anti-insulina, incluyendo lipólisis, hiperglicemia, e hiperinsulinemia. Los efectos anabólicos de la GH conducen a un aumento en la síntesis proteica y por tanto de la masa muscular (Corpas E et al. 1993). En cuanto a los efectos de la GH sobre la diferenciación celular, se ha visto que la hormona estimula la diferenciación de preadipocitos 3T3 a adipocitos (Morikawa M et al. 1982), y que participa en



**Figura 5. Acciones generales del eje GH/IGF-1. La liberación pulsátil a la circulación de GH induce la producción de IGF-1, mediador de los efectos promotores del crecimiento de la hormona.**

el desarrollo y diferenciación de diversos tejidos como músculo, sistema nervioso, próstata y glándula mamaria (Sanders EJ & Harvey S. 2004) (Tabla 1).

<b>Efectos generales de la GH</b>
<b>Crecimiento postnatal longitudinal</b>
<b>Mantenimiento del sistema inmune</b>
<b>Efectos positivos a nivel corporal:</b>
<b>Resistencia muscular</b>
<b>Capacidad reproductiva</b>
<b>Propiedades de la piel</b>
<b>Efectos sobre el metabolismo celular:</b>
<b>Lípidos</b>
<b>Carbohidratos</b>
<b>Nitrógeno</b>
<b>Minerales</b>
<b>Viabilidad celular</b>
<b>Diferenciación celular</b>

**Tabla 1. Principales acciones orgánicas de la GH.**

Por otro lado, también se ha comprobado que la GH juega un papel importante en el mantenimiento del sistema inmune (Kopchick JJ & Andry JM. 2000). Además, también tiene efectos positivos a nivel corporal en la resistencia muscular, capacidad reproductiva, propiedades de la piel, y funciones metabólicas (De Boer H et al. 1995).

#### **4.1. Efectos cardíacos del eje GH/IGF-1**

Como se cita en el apartado anterior, la relación existente entre GH/IGF-1 ha quedado demostrada en multitud de estudios experimentales. La GH actúa promoviendo la producción hepática de IGF-1 de forma que éste va a mediar los efectos de la GH en tejidos periféricos (Colao A et al. 2004). También se ha visto que GH estimula la síntesis del ARNm de IGF-1 (Isgaard J et al. 1989). A nivel cardíaco, ambas hormonas participan en la regulación del crecimiento del corazón durante el desarrollo así como en el mantenimiento de su estructura (Colao A et al. 2001). La secreción de GH interviene de forma relevante en el desarrollo cardíaco postnatal, como se comprobó en un modelo de ratas hipofisectomizadas, donde la expresión en el corazón del ARNm de IGF-1 estaba disminuida. La administración exógena de GH fue capaz de revertir esta situación, aumentando los niveles proteicos de IGF-1 en el corazón mediante la estimulación de su producción por parte del miocardio (Flyvbjerg A et al. 1991). Estos efectos desembocarían en un crecimiento del tejido por un mecanismo paracrino o

autocrino (Saccá L et al. 1994, Silverman BL et al. 1997, Volterrani M et al. 2000), aunque esto no descarta que IGF-1 pueda actuar como un factor endocrino, proveniente de la circulación sistémica (Saccá L et al. 1994). Otras evidencias de los efectos de GH e IGF-1 sobre el desarrollo cardíaco postnatal fueron la demostración de que GH e IGF-1 exógenos inducían una respuesta hipertrófica en ratas normales (Cittadini A et al. 1996), y que IGF-1 era capaz de aumentar el contenido de calcio intracelular y potenciar la sensibilidad al calcio de los miofilamentos de cardiomiocitos (Xu XP & Best PM. 1991).

Por otro lado, no era del todo claro si los efectos a nivel miocárdico de la GH podían ser directos o mediados a través de IGF-1. A este respecto, ha quedado demostrado que la hormona de crecimiento es capaz de ejercer efectos directos sobre los cardiomiocitos a través de la unión a su receptor, y que dichos efectos son independientes de la acción de IGF-1 (Lu C et al. 2001). Estos autores demostraron que los efectos pro-hipertróficos de la GH sobre los cardiomiocitos son independientes de alteraciones en los niveles de IGF-1.

Por tanto, los efectos de la GH sobre el miocardio están mediados tanto por mecanismos directos como indirectos (Saccá L et al. 1994, Silverman BL et al. 1997, Volterrani M et al. 2000), siendo estos últimos derivados de la acción de IGF-1. Una evidencia que indicaría esto, es el hecho que los receptores de GH e IGF-1 se expresan en los cardiomiocitos. Los niveles de expresión del gen del receptor de GH son mayores en el miocardio que en muchos otros tejidos (Mathews LS et al. 1989).

## **5. GH e hipertrofia cardíaca**

El eje GH/IGF-1 está involucrado en la intrincada serie de eventos conectados con la regulación del desarrollo e hipertrofia del corazón, regulando el crecimiento, función y estructura del mismo (Lombardi G et al. 1997, Isgaard J et al. 1999). Se ha demostrado como en modelos animales, una sobrecarga de presión y volumen inducía una sobrerregulación de la expresión del gen de IGF-1, de forma que estaría contribuyendo a un desarrollo de hipertrofia cardíaca (Hanson MC et al. 1993). Asimismo, también se ha comprobado como, bajo este estímulo, la expresión del ARNm del receptor de GH se ve aumentada seguido de un incremento en el mensajero de IGF-1 (Isgaard J et al. 1994). Un estudio realizado en el año

1993 por Ito H et al., representó la primera demostración de como IGF-1 causa hipertrofia miocitaria, incrementando el tamaño de cardiomiocitos cultivados y simultáneamente induciendo la expresión de genes específicos de músculo. Estudios realizados sobre cultivos primarios de cardiomiocitos han caracterizado la inducción por parte de IGF-1 de la vía JAK/STAT, al igual que ocurre con GH (Takahashi T et al. 1999). Cittadini A et al. (1996), demostraron que la administración de GH o IGF-1, o la combinación de ambas hormonas, a ratas adultas normales, inducía un aumento significativo del tamaño del ventrículo izquierdo sin desarrollo de fibrosis significativa. En concordancia con estos resultados, el trabajo de Duerr RL et al. (1995) observó que la administración subcutánea de IGF-1 a ratas, producía una hipertrofia ventricular izquierda significativa. Otro trabajo presentado por Grima D et al. (1998), comprobó la aparición de hipertrofia del ventrículo izquierdo tras inyección subcutánea de GH a ratas normales. Estos dos últimos trabajos además, demostraron de forma respectiva, que IGF-1 y GH son capaces de inducir hipertrofia en el miocardio que permanece viable tras modelos experimentales de infarto.

Este efecto hipertrofico de la GH podría tener relevancia clínica en el tratamiento de una patología cardíaca como la cardiopatía dilatada. Ésta se da como una respuesta adaptativa del corazón a distintos trastornos que ocurren en el mismo, como por ejemplo los derivados de hipertensión, infarto de miocardio, arritmias cardíacas, problemas endocrinos, etc. Así, se ha visto que la administración de GH a pacientes con cardiomiopatía dilatada producía una mejora en la fracción de eyección y un aumento en la masa del ventrículo izquierdo (Perrot A et al. 2001).

## **6. GH y contractilidad y viabilidad cardiomiocitaria**

Experimentos realizados *in vitro* muestran como la administración de dosis fisiológicas de IGF-1 son capaz de estimular la contractilidad de los cardiomiocitos (Hussain MA et al. 1998). Incluso se ha planteado la hipótesis de que IGF-1 sea capaz de inducir proliferación y/o inhibir la apoptosis de cardiomiocitos dañados (Hussain MA et al. 1998). Sobre este aspecto inhibidor de IGF-1 se han publicado varios experimentos corroborándolo (Wang Y et al. 1998, Lee WL et al, 1999, Chen DB et al, 2000). Estos efectos beneficiosos sobre el corazón, han sido

también puestos de manifiesto en otros estudios desarrollados en ratas normales y ratas con infarto de miocardio inducido. En ambos modelos se ha determinado que GH e IGF-1, solas o en combinación, mejoran la función cardíaca (Isgaard J et al. 1999).

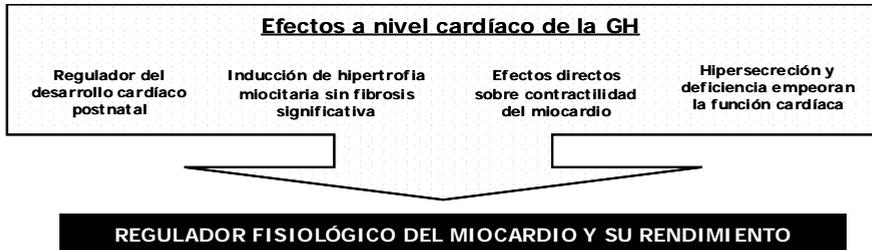


Figura 6. La hormona de crecimiento se muestra como un modulador de la estructura y función cardíacas.

## 7. Exceso y deficiencia de GH y función cardíaca

Se sabe que tanto la hipersecreción como la deficiencia de GH se caracterizan por un empeoramiento de la función cardíaca (Saccá L et al. 1994). La importancia de la GH en la regulación del crecimiento y funcionamiento cardíaco ha sido puesta de manifiesto los últimos años por los numerosos estudios realizados en estados donde la secreción de GH se presenta alterada.

### 7.1. Exceso de GH

La acromegalia, se define como la condición clínica caracterizada por un exceso de GH crónico causado por una secreción de GH no restringida, en la mayoría de los casos inducida por un adenoma somatotropo de la hipófisis (Melmed S. 1990). La acromegalia presenta una elevada prevalencia de anomalías cardiovasculares, dándose una elevada mortalidad asociada. La principal anomalía cardiovascular derivada de la acromegalia es la cardiomegalia que consiste en un alargamiento o estiramiento del corazón (Melmed S. 1990). Este aumento de tamaño del corazón se debe principalmente al desarrollo de una hipertrofia concéntrica del miocardio (Figura 7). Se caracteriza

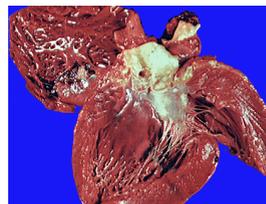


Figura 7. La acromegalia deriva en la cardiomegalia, caracterizada por la presencia de hipertrofia miocárdica.

porque la masa del ventrículo izquierdo aumenta, mientras que las dimensiones del ventrículo permanecen dentro del rango normal. Son muchos los cambios que ocurren a nivel celular y subcelular en acromegalia. En un principio esta hipertrofia es una respuesta adaptativa a la acromegalia, que si persiste, pasará a ser maladaptativa dando lugar a insuficiencia cardíaca. La cardiomegalia suele ir acompañada de otros problemas como la hipertensión arterial, la cual afecta a uno de cada tres pacientes con acromegalia (Fazio S et al. 1993), y puede acelerar el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Lopez-Velasco R et al. 1997). Otras complicaciones asociadas son enfermedad coronaria (CAD, coronary arteri disease), fibrosis intersticial, lo que producirá arritmias ventriculares que pueden llegar a causar la muerte, e insuficiencia cardíaca congestiva (Saccá L et al. 1994, Lombardi G et al. 1997, Silverman BL et al. 1997, Volterrani M et al. 2000). Por tanto se puede decir que la acromegalia presenta dos etapas, la primera se caracteriza por anomalías morfológicas, y la segunda por anomalías funcionales. Los principales cambios morfológicos que se dan en el corazón son un aumento de la masa ventricular y del grosor de la pared de ambos ventrículos, afectaciones de la válvula mitral y más frecuentemente aórtica, y dilatación de la cavidad. Entre las afectaciones funcionales, cabe destacar las ya mencionadas arritmias ventriculares, cuya frecuencia aumenta con la duración de la acromegalia y no se relaciona con los niveles circulantes de GH (Kahaly G et al. 1992). Los índices de función sistólica en pacientes acromegálicos en reposo son normales, mientras que el llenado diastólico es anormal, involucrando a ambos ventrículos (Morvan D et al. 1991, Fazio S et al. 1993). Por otro lado, el corazón acromegálico presenta un empeoramiento en la función cardíaca en esfuerzo debido a la disfunción diastólica (Fazio S et al. 1994) (Figura 8).

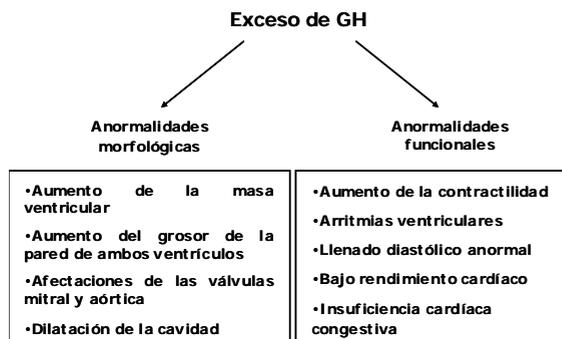


Figura 8. Cambios morfológicos y funcionales derivados de enfermedad cardíaca acromegálica.

Un dato curioso que se ha observado en acromegalia, es la escasa correlación entre la hipertrofia del corazón y los niveles circulantes de GH o IGF-1 (Savage DD et al. 1979). Lo que si se ha relacionado positivamente, es la asociación existente entre el grado de hipertrofia y la duración de la enfermedad (Saccá L et al.1994).

El exceso de GH sobre el corazón va a tener una serie de consecuencia hemodinámicas mediadas tanto por mecanismos directos como indirectos. Estas consecuencias se deben al efecto de la GH sobre el crecimiento y contracción del tejido miocárdico, así como a cambios en la resistencia periférica y carga de volumen.

Desde el punto de vista hemodinámico, la hipertrofia cardíaca se trata de una respuesta adaptativa del corazón con el fin de normalizar el estrés desarrollado sobre la pared debido a una sobrecarga crónica de trabajo (Grossman W et al. 1975, Sasayama S et al. 1976). Este hecho se daría en base a un aumento del grosor de la pared, compensando los efectos negativos de un aumento en la presión y volumen. Existen dos rasgos que caracterizan a la hipertrofia cardíaca en acromegalia. El primero sería el engrosamiento de la pared iniciado sin un aumento del estrés de la misma, y el segundo sería el proceso hipertrófico simultáneo que sufren ambos ventrículos. Ambos comprenderían los efectos de la GH sobre el miocardio. Existe una relación entre acromegalia e hipertensión, así, se ha visto que existe un mayor aumento de la masa ventricular en pacientes acromegálicos hipertensos que normotensos (Morvan D et al. 1991, Fazzio S et al. 1993).

Existen varios estudios desarrollados en animales que sugieren que la hormona de crecimiento estimula la contractilidad (Penney DG et al. 1985, Timsit J et al. 1990, Mayoux E et al. 1993). Sin embargo, los datos existentes a este respecto determinados *in vivo* son muy escasos, por lo que las especulaciones sobre la GH y contractilidad están basadas en evidencias indirectas derivadas de la observación de la capacidad contráctil en acromegalia.

Desde mediados de la década de los 80, se han desarrollando una serie de investigaciones que sugieren que el control terapéutico de la cardiopatía acromegálica supondría una disminución en la progresión de los desórdenes cardíacos derivados de ésta. En este punto ha jugado un papel muy importante el descubrimiento de un análogo de somatostatina, el

octreotide. Este péptido es capaz de inhibir la liberación de GH y suprimir el carácter pulsátil de la secreción de GH residual (Bauer W et al. 1982). Los efectos de la supresión de GH con octreotide sobre la disfunción cardíaca han sido estudiados, y los resultados disponibles muestran claramente un efecto favorable del octreotide (Giustina A et al. 1995). Por otro lado, por los datos existentes se puede decir que la hipertrofia cardíaca desarrollada por un exceso de GH puede ser corregida controlando a largo plazo la actividad normal de la GH. Sin embargo, los estudios desarrollados con este péptido han sido a corto plazo, lo que hace que no se pueda decir que a largo plazo este tratamiento corrija de forma completa la disfunción cardíaca existente en la cardiopatía acromegálica.

De forma más reciente, se han desarrollado análogos de somatostatina de liberación lenta como el lanreotide. Este producto se ha visto que disminuye de forma significativa los valores medios de GH (Caron P et al. 1997), y mejora la función cardíaca en pacientes con acromegalia (Volterrani M et al. 2000).

## **7.2. Deficiencia de GH**

La deficiencia de GH (GHD) presenta un elevado índice de mortalidad. Las consecuencias que la GHD ejerce sobre el sistema cardiovascular dependen en gran medida de la edad a la que se padezca. Es decir, en período de desarrollo del corazón las repercusiones serán mayores comparado con las que pueda tener esta deficiencia en adultos, cuando el órgano está totalmente desarrollado (Volterrani M et al. 2000). Desde el punto de vista funcional, uno de los principales problemas que plantea esta deficiencia, es un empeoramiento de la función cardíaca, en particular existe un empeoramiento en la capacidad de realizar ejercicio, aunque dichos problemas pueden ser corregidos mediante tratamiento específico. Esto vendría a indicar que la GH esta desarrollando un importante papel en el mantenimiento fisiológico de la estructura y función cardíaca normales (Cittadini A et al. 1994).

El tratamiento con la hormona a individuos GH deficientes puede prevenir el riesgo de desarrollar lesiones ateroscleróticas y por tanto minimizar el riesgo cardiovascular (Cuneo RC et al. 1993). Esto se demostró al observarse que la terapia con GH solventaba las alteraciones

básicas del metabolismo de lípidos, relacionadas con un incremento del riesgo cardiovascular (Cuneo RC et al. 1993).

La deficiencia de GH también ha puesto de manifiesto el papel de la hormona en el mantenimiento fisiológico de la estructura y función cardíacas normales. Modelos experimentales mostraron como la hipofisectomía suponía una disminución en el tamaño del corazón, la cual podía ser revertida mediante la administración de GH (Beznak M. 1954, Hjalmarson A et al. 1969). Un seguimiento realizado sobre una serie de pacientes que desarrollaron GHD en la etapa prepuberal determinó que estos individuos presentaban una reducción evidente de la masa del ventrículo izquierdo y un marcado empeoramiento de la función sistólica de dicho ventrículo (Merola B et al. 1993, Amato G et al. 1993). Una terapia de reemplazamiento con GH tuvo como resultado la normalización de la masa del ventrículo izquierdo y una mejora significativa de la función cardíaca en reposo y durante ejercicio. Aquí queda demostrada la presencia de anormalidades cardíacas, tanto estructurales como funcionales, en pacientes adultos con inicio de la deficiencia de GH en la infancia. Sin embargo, otros trabajos muestran como individuos con GHD iniciada en la madurez, presentan una masa ventricular izquierda y una función cardíaca similar a los individuos sanos (Cuneo RC et al. 1991, Shahi M et al. 1992). Posteriormente, el grupo de Merola publicó un trabajo cuyos resultados muestran que la presencia de una deficiencia de GH duradera (GHD en infancia y en madurez) deriva en una disfunción sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo, tanto en reposos como durante ejercicio, lo que sugiere que la GH en humanos está jugando un papel fisiológico en el mantenimiento del funcionamiento cardíaco normal (Lombardi G et al. 1997). Estos resultados indicarían que en adultos jóvenes GHD, la edad de inicio de la deficiencia no sería tan clave en el desarrollo del daño cardíaco como la duración de esta pérdida de GH.

## **8. GH y apoptosis**

La apoptosis es un proceso importante en la determinación de la morfología del corazón durante la etapa de desarrollo prenatal (James TN. 1994). Pero en el corazón adulto este papel no estaba muy claro. Hasta hace poco los cardiomiocitos se consideraban células totalmente

diferenciadas incapaces de dividirse y sufrir apoptosis. Hoy existen datos en la bibliografía que muestran la capacidad de estas células para replicarse así como para entrar en apoptosis (Anversa P & Kajstura J. 1998). Algunos autores apuntan hacia la idea de que un exceso de apoptosis cardiomiocitaria derivaría en una importante pérdida de estas células. Esto podría tener consecuencias sobre la evolución de la disfunción ventricular a insuficiencia cardíaca terminal, en cardiopatías como la isquémica o la hipertensiva (Anversa P et al. 1998). Hoy en día son muchos los trabajos que muestran la incidencia de la apoptosis de los cardiomiocitos en isquemia/reperfusión, infarto de miocardio, cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca.

Teniendo en cuenta los efectos cardíacos de la hormona de crecimiento citados anteriormente, parece claro que ésta desempeña un papel muy importante en el buen funcionamiento del sistema cardiovascular, siendo un regulador fisiológico fundamental del crecimiento del miocardio y de su rendimiento (Lombardi G et al. 1997). Por tanto, resulta lógico pensar que esta hormona pueda estar afectando al proceso apoptótico de alguna forma, y en consecuencia actuando como un regulador de la viabilidad del miocardio.

Son varias las demostraciones de la acción de la GH sobre el proceso apoptótico en diversos tipos celulares. Estas demostraciones comprenden trabajos que hablan tanto de un efecto anti- como pro-apoptótico de la hormona (Tabla 2). En el año 1999, Costoya JA et al., demostraron en células HL-60 (células de leucemia humana), y en células CHO (células de ovario de hámster chino), como el tratamiento con GH era capaz de inhibir la muerte celular programada inducida por privación de suero. Otro trabajo presentado por Haeffner A et al. (1999), mostró un efecto beneficioso de la hormona sobre la apoptosis de monocitos mediada por Fas. El posterior trabajo presentado por Sirotkin AV & Makarevich AV (1999), demostró una disminución significativa de la incidencia de la apoptosis sobre células de granulosa bovina en cultivo. Este efecto era dependiente de la activación por parte de GH del sistema AMPc/proteína quinasa A. Un trabajo posterior del año 2000, desarrollado en la línea celular de ratón Ba/F3 (células pro B), mostró el efecto preventivo de la GH frente a apoptosis inducida por ausencia de interleuquina 3 (IL-3) y suero (Jeay S et al. 2000). Se comprobó que las propias células sintetizaban GH endógena, la cual actuaría mediante un mecanismo autocrino. Este

mismo año se publicó una nueva demostración del efecto anti-apoptótico de la GH sobre células intestinales (Mylonas PG et al. 2000). Este trabajo se basa en un método de inducción de apoptosis por daño celular mediado por radiación sobre la mucosa intestinal de ratas. Una demostración reciente de un efecto anti-apoptótico de la hormona de crecimiento ha sido publicada en el año 2003 por Segard HB et al. Estos autores analizaron el papel de la GH en mioblastos C2C12, y sugieren que estas células serían capaces de sintetizar GH endógena, la cual actuaría de forma autocrina regulando la supervivencia celular. Estas son algunas de las publicaciones existentes que relatan el efecto beneficioso de la hormona de crecimiento sobre el proceso de apoptosis, sin embargo actualmente son muchas más las demostraciones en este sentido, afectando a una importante variedad celular.

Por el contrario a todos estos ejemplos de demostraciones de un efecto anti-apoptótico de la hormona de crecimiento, también existen datos en la bibliografía que reflejan un efecto pro-apoptótico por parte de la misma. Kiya T et al. (1999), presentaron un trabajo demostrando un efecto apoptótico de la GH sobre la luteolisis. La administración de GH inducía una luteolisis estructural, donde células apoptóticas aparecían entre células lúteas. Los autores sugieren que la inducción de apoptosis por parte de la hormona, a través de deficiencias en la mitosis celular, desencadenaría el proceso de luteolisis estructural. Por último comentar que en la bibliografía también se ha reflejado un estudio en que la GH no presenta ninguna incidencia sobre la apoptosis. En este trabajo se ha determinado el papel que puede tener la administración de GH sobre células germinales de testículo bovino en cuanto al proceso de muerte celular programada (Santos RL et al. 1999). La administración de GH no incrementó la incidencia de apoptosis frente al grupo control, la localización de células germinales apoptóticas no difirió entre grupos.

<b>La GH es un regulador de la viabilidad celular</b>		
<b>Modulador de la muerte celular por apoptosis</b>		
<b>Anti-apoptótico:</b>		<b>Pro-apoptótico:</b>
<b>Inhíbe la producción de citoquinas pro-inflamatorias</b>	<b>En células: HL-60, CHO, Monocitos, Granulosa bovina, Ba/F3, Células intestinales, C2C12</b>	<b>Induce luteolisis estructural</b>

**Tabla 2. Diversas evidencias muestran a la GH como un regulador de la viabilidad celular a través de acciones anti y pro-apoptóticas.**

Por todo lo expuesto anteriormente, nos planteamos la posibilidad de que los efectos beneficiosos de GH a nivel cardíaco estén mediados, al menos en parte, por una regulación por parte de la hormona sobre la viabilidad cardiomiocitaria.

## **OBJETIVOS HORMONA DE CRECIMIENTO**



El objetivo principal planteado en este trabajo ha sido: **determinar si la hormona de crecimiento (GH) es capaz de ejercer un efecto protector frente a la apoptosis en cardiomiocitos**. Para la consecución de este objetivo, se han planteado una serie de objetivos secundarios:

1. Comprobar la idoneidad del modelo cardiomiocitario mediante el análisis de la funcionalidad del receptor de GH (GHR) en estas células.
2. Analizar si la acción de GH en cardiomiocitos es directa o mediada por IGF-1.
3. Identificar proteínas que puedan estar mediando el efecto de GH en cardiomiocitos.



## **MATERIAL Y MÉTODOS HORMONA DE CRECIMIENTO**



## 1. Cultivos celulares

### 1.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata

La obtención de los cardiomiocitos se realizó a partir de corazones de neonatos de ratas Sprague Dawley de edad comprendida entre 24-48 horas. La razón por la que se utilizaron neonatos de esta edad es porque los cardiomiocitos presentan aún capacidad de división, lo que permite obtener células que se van a poder dividir una o dos veces tras la siembra.

Los corazones extraídos se trocearon en pequeñas porciones y se mantuvieron en tampón Ads (6.8 g/l NaCl, 4.76 g/l HEPES, 0.12 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 g/l glucosa o dextrosa, 0.4 g/l KCl, 0.1g/l  $\text{MgSO}_4$ , 0.0 2g/l rojo fenol pH 7.35) hasta su digestión. Las digestiones de los corazones se realizaron en una solución enzimática de composición: tampón Ads + Colagenasa (80 unidades/ml) + Pancreatina (0.6 mg/ml) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA).

Se realizaron 5 digestiones. La primera de 30 minutos se desechó, las cuatro posteriores fueron de 20 minutos de las cuales se recoge el sobrenadante. El volumen utilizado de solución enzimática dependió del número de corazones utilizados siguiendo la siguiente correspondencia:

NÚMERO DE CORAZONES	VOLUMEN (ml)/ DIGESTIÓN
0-14	6
15-19	8
20-24	9
25-29	10
30-34	11
35-50	12

Cada uno de los sobrenadantes se recogió, se le añadió un 10% de suero de ternera recién nacida (NCS), y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 23-25 °C. El total de células obtenido se resuspendió en el medio de cultivo o Plating Media (DMEM, Medio 199, 10% HS (suero de caballo), 5% FCS (suero fetal de ternera) o FBS (suero fetal bovino), antibiótico, fungizona y glutamina.

Con el fin de aumentar la pureza del cultivo, se realizó una siembra diferencial durante 2-3 horas sobre superficies de cultivo no tratadas con matriz extracelular. De esta forma, gran parte de los fibroblastos aislados se adhieren a la placa de cultivo mientras que los cardiomiocitos quedan en suspensión.

Posteriormente se recogió el medio de cultivo, se procedió al contaje celular, distinguiendo células vivas de células muertas mediante Tripán Blue, y se realizó la siembra a la densidad deseada en placas de cultivo tratadas con fibronectina. Al medio de cultivo se añadió el citostático arabinósido de citosina (AraC, 10  $\mu$ M) (Citarabina, Pharmacia & Upjohn, Barcelona, España) con el fin de inhibir la proliferación de fibroblastos.

### **1.2. Línea celular de ratón HL-1**

La línea celular de cardiomiocitos de ratón HL-1 es una donación del Doctor WC Claycomb (Louisiana S.U., Medical Center, N. Orleans LA). Estas células derivan de la línea tumoral de cardiomiocitos atriales AT-1. Las células HL-1 pueden ser pasadas en cultivo de forma seriada, y mantienen la habilidad de contraerse de forma espontánea, además de retener las propiedades morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas de un cardiomiocito diferenciado. Además, estas células se pueden mantener almacenadas en nitrógeno líquido, y posteriormente pueden ser descongeladas sin que varíe su fenotipo. Presentan un patrón de expresión genética similar al de un cardiomiocito adulto, ya que expresan la cadena pesada de la miosina- $\alpha$  cardíaca,  $\alpha$ -actina cardíaca y connexina 43 (Claycomb WC et al. 1998).

La utilización de métodos microscópicos, inmunohistoquímicos, electrofisiológicos y farmacológicos, ha permitido la caracterización de los cardiomiocitos HL-1 (Claycomb WC et al. 1998). Se ha comprobado que estas células presentan las estructuras sarcoméricas organizadas necesarias para la contracción, así como gránulos de péptido atrial natriurético (ANP) característicos de cardiomiocitos atriales. Son capaces de despolarizarse de forma espontánea y poseen los canales iónicos necesarios para la generación de los potenciales de acción. Además, las células presentan respuesta a agonistas ionotrópicos y cromotrópicos, lo que indica presentan la maquinaria necesaria para estas vías de señalización (Claycomb WC et al. 1998).

Esta línea celular ha sido extensamente utilizada en estudios de biología cardíaca a nivel celular y molecular. Además de haber sido utilizada para estudios funcionales relacionados con señalización, regulación eléctrica, metabólica y transcripcional, esta línea también se ha usado para el estudio de condiciones patológicas tales como hipoxia, hiperglucemia-hiperinsulinemia,

apoptosis e isquemia reperusión. Todos estos trabajos han sido revisados recientemente por White SM et al. (2004). Toda esta serie pone de manifiesto la idoneidad de este modelo celular para el desarrollo de estudios relacionados con la biología del corazón y en particular de los cardiomiocitos.

El cultivo de las células HL-1 se realizó sobre superficies tratadas con la proteína de matriz extracelular fibronectina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), disuelta en una solución de gelatina 0.02%. Las células se mantuvieron en medio Claycomb (JRH Biosciences, Andover, Reino Unido) suplementado con 10% de FBS (suero bovino fetal) (Life Technologies Ltd. Poole, UK), noradrenalina 100 $\mu$ M (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), L-glutamina 2mM (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), y penicilina (100U/ml)/estreptomocina (100 $\mu$ g/ml); a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió cada 24 horas.

Las células se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar un 90-95% de confluencia sobre la superficie de cultivo, para posteriormente ser pasadas mediante la utilización de una solución de Tripsina-EDTA (1x). Para la realización de los ensayos se cultivaron hasta alcanzar un 80-90%, momento en el cual se realizó la privación en medio ExCell 320 parte A + ExCell 320 parte B (JRH Biosciences, Andover, Reino Unido) sin suero ni noradrenalina.

## **2. Técnicas utilizadas**

### **2.1. Extracción de ARN mediante TRIzol<sup>®</sup>**

La extracción de ARN tanto de cultivos celulares como de tejidos se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies Ltd. Poole, UK) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los volúmenes utilizados variaron en función de la cantidad de células, a partir de la cual se extrajo el ARN, y del tamaño de tejido utilizado. Por cada plato de cultivo de 3.5 cm de diámetro, y por cada 100 mg de tejido aproximadamente, se utilizó 1 ml de TRIzol<sup>®</sup>.

Células en monocapa: se añadió directamente sobre la capa celular 1 ml de reactivo. Ayudados de un émbolo de jeringa se lisaron las células arrastrándolo sobre la superficie de la placa de cultivo.

Tejido: Las muestras previamente congeladas, se homogeneizaron de forma mecánica utilizando para ello un Polytron. Sobre el tejido aún congelado, se añadió el TRIzol® para ser sometido a varios ciclos de homogenización. El proceso se realizó en hielo para evitar la degradación del ARNm.

A continuación, el lisado, tanto de células como de tejido, se transfirió a tubos de polipropileno donde se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Posteriormente se añadieron 200 µl de cloroformo a cada muestra, se agitaron de forma vigorosa y se incubaron a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000x g 15 minutos a 4°C.

Tras la centrifugación, las muestras se separaron en dos fases (acuosa y orgánica) de las cuales se recoge la acuosa (superior). Ésta se transfirió a nuevos tubos de polipropileno donde se mezcla con 500 µl de isopropanol con el fin de precipitar el ARN. Se deja incubar 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifuga a 12000x g 10 minutos a 4 °C.

El sobrenadante se retiró y el ARN precipitado se lavó en 500-1000 µl de etanol al 75%-DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato). El lavado se realizó mediante agitación de los tubos, para un a posterior precipitación de ARN centrifugando a 7500x g 5 minutos a 4 °C.

Por último, el sobrenadante se retiró, el ARN se secó y posteriormente se resuspendió en agua-DEPC libre de ARNasas.

## **2.2. Tratamiento con DNAsas**

El tratamiento se realizó mediante la incubación del ARN con DNAsa I (Life Technologies Ltd. Poole, UK) y ARNasa OUT (Life Technologies Ltd. Poole, UK) durante 2 horas a una temperatura de 37 °C. Se utilizaron por cada 5µg de ARN 20 unidades de DNAsa I y 20 unidades de ARNasa Out. Este tratamiento se realizó para evitar contaminaciones con ADN genómico. Pasadas las 2 horas de tratamiento, las enzimas se inactivaron incubando las muestras durante 5 minutos a 95 °C en un bloque térmico.

### **2.3. Extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico**

Una vez realizado el tratamiento, se purificaron las muestras mediante una extracción fenol, cloroformo-isoamilalcohol.

Las muestras se llevaron a 200  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O DEPC y se les añadió un volumen igual de fenol. Se agitaron y centrifugaron a 14000 rpm 4 minutos a 4 °C para separar la fase orgánica de la acuosa conteniendo el ARN. Se recogió el sobrenadante, se pasó a un tubo nuevo de polipropileno y se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamilalcohol en proporción 25:24:1. Se agitaron las muestras y centrifugaron a 14000 rpm 4 minutos a 4 °C. Nuevamente se recuperó la fase acuosa a un tubo nuevo donde se mezcló con un volumen igual de cloroformo:isoamilalcohol 25:1. Las muestras se agitaron y centrifugaron a 14000 rpm 4 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo, para posteriormente añadir dos volúmenes de etanol 96% frío (-20°C) y acetato sódico 3 M para obtener una concentración final de 0.3 M. La mezcla se dejó toda la noche a -80 °C para precipitar el ARN. Transcurrido el tiempo de precipitación los tubos se centrifugaron a 14000 rpm 20-30 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Por último el ARN se resuspendió en agua DEPC.

### **2.4. Retrotranscripción (RT)**

La reacción de retrotranscripción se realizó en un volumen final de 30 $\mu$ l partiendo de 1 o 2 $\mu$ g de ARNm.

El ARNm se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) mediante una incubación de 50 minutos a 37 °C, 15 minutos a 42 °C y 5 minutos a 95 °C con 200 unidades de Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT; Life Technologies Ltd. Poole, UK), 6 $\mu$ l de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, 10mM de cada dNTP), 6 $\mu$ l de tampón 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>; Life Technologies Ltd. Poole, UK), 1.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.17  $\mu$ l de una solución de cebadores inespecíficos (3  $\mu$ g/ $\mu$ l; Life Technologies Ltd. Poole, UK) y 0.25  $\mu$ l de inhibidor de ribonucleasas (RNAase

OutTM, 40 u/μl; Life Technologies Ltd. Poole, UK); la reacción se llevó al volumen final con agua.

### **2.5. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

3 μl del ADNc obtenido en la retrotranscripción se amplificaron en la reacción de PCR utilizando unos cebadores específicos.

Las condiciones utilizadas en la amplificación fueron las siguientes: 5 μl de tampón 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4 y 500 mM KCl; Life Technologies Ltd. Poole, UK), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 150 ng de cada cebador (sentido/antisentido) y 1.25 U de Taq DNA Polymerase (Life Technologies Ltd. Poole, UK). El volumen final de reacción se completo hasta 50 μl con agua.

Los cebadores utilizados en cada una de las reacciones, así como las condiciones de amplificación de los mismos quedan reflejadas en las Tablas 1 y 2 respectivamente.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa cuyo porcentaje varió entre 1-2% en función del tamaño de fragmento a separar, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un Typhoon 9410 Documentation System (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania).

### **2.6. Unión específica ligando-receptor (GH-GHR) en células HL-1**

Para llevar acabo este ensayo,  $5 \times 10^5$  células HL-1 fueron sembradas en platos de 6 pocillos. Por cada punto del ensayo se sembraron dos pocillos para la realización del experimento por duplicado, excepto para los puntos de unión total (TB) y unión no específica (NSB). Las células se mantuvieron en medio Claycomb completo hasta que alcanzaron una densidad superior al 80%. Tras esto se privaron de suero durante 4 horas en medio ExCell A + B.

Posteriormente las células se incubaron durante toda la noche a 4 °C en 1ml de tampón PBS conteniendo 0.1% de BSA (albúmina bovina sérica),  $10^5$  cpm/ml de GH recombinante humana marcada con <sup>125</sup>I ([<sup>125</sup>I]hGH), y concentraciones crecientes de la hormona hGH sin marcar (hormona fría).

De esta forma se consiguió una competencia entre la hormona marcada y la fría por los sitios de unión al receptor, donde la hormona fría fue desplazando a la marcada a medida que se añadieron concentraciones crecientes de la primera. Las concentraciones de GH fría fueron: 1 ng/ml, 5 ng/ml, 7.5 ng/ml, 20 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml y 3 µg/ml.

Unión total (TB): no se añade hormona fría por lo que toda la marcada se va a unir.

Unión no específica: se añade una concentración saturante de hormona fría que desplaza por completo a la marcada, de forma que la unión que se produzca de ésta será inespecífica

Tras incubar las células durante toda la noche, éstas fueron mantenidas en todo momento sobre hielo, y lavadas 4 veces con tampón PBS frío. Una vez realizados los lavados, se lisaron las células en 1ml de 0.1 M NaOH pasando reiteradas veces el lisado por la punta de pipeta.

La radiactividad asociada a cada uno de los lisados se midió en un contador-γ. El análisis de los resultados obtenidos se realizó mediante la utilización del programa Ligand (Munson PJ & Rodbard D. 1980).

## **2.7. Inmunoprecipitación y Western Blot**

Esta técnica permitió analizar la activación de distintas proteínas ubicadas en la vía de señalización de la hormona de crecimiento: GHR, JAK2, STAT5, p38 MAPK.

Para ello se sembraron un total de  $3 \times 10^6$  células HL-1 en placas de 100 mm de diámetro. Una vez pegadas, y tras la serodeprivación de 4 horas en medio DMEM (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) o ExCell A+B, se realizaron los tratamientos con GH recombinante humana (Saizen, Serono, Madrid, España). Los tratamientos se realizaron a la dosis de 1 µg/ml durante 5, 15 y 30 minutos, para la posterior detección de la activación de GHR; y durante 15 y 30 minutos para el análisis de la activación de JAK2 y STAT5.

En el caso del estudio de p38 MAPK, los tratamientos consistieron en un pretratamiento con GH (1 µg/ml) durante 12 horas, en medio ExCell A+B (JRH Biosciences, Andover, Reino Unido) sin suero, antes de la incubación de las células con el citostático AraC (100 µM) (Citarabina, Pharmacia & Upjohn, Barcelona, España) durante 24 horas. Este tratamiento con AraC se utilizó como método de inducción de apoptosis en cardiomiocitos HL-1 (Geller HM et

al. 2001). El citostático tiene un efecto inhibidor de la proliferación celular de forma que las células entran en apoptosis.

Transcurrido el tiempo de tratamiento la reacción se detuvo colocando las placas de cultivo sobre hielo y lavando las células con PBS frío (4-8 °C). Se retiró el tampón y se procedió al lisado celular añadiendo 500 µl de solución de lisis (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 250 mM NaF, 30 mM Pirofosfato sódico, 0.5 M EDTA, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina). Para facilitar la lisis se raspó la superficie de la placa de cultivo.

Los lisados se transfirieron a tubos de polipropileno y se incubaron en hielo durante 15-20 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugaron a 14000 rpm 20 minutos a 4 °C. En el caso del estudio de STAT5, las células fueron sometidas a un proceso de sonicado previo a la centrifugación. El fin fue romper las membranas nucleares y las uniones entre proteína y ADN, ya que STAT5 es un factor de transcripción que se une al ADN para regular la expresión génica.

Este proceso se realizó metiendo las muestras en el sonicador con una mezcla de agua-hielo para evitar el calentamiento de las mismas. El sonicador se dejó actuar durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se agitaron las muestras, se dejaron reposar en hielo entre 15-20 minutos, y se centrifugaron a 15000-18000 rpm 25 minutos a 4 °C.

Tras centrifugar, el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se realizó la cuantificación de la proteína mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrabe, Munchen). Consiste en un método colorimétrico que a partir de una recta estándar preparada con una proteína de concentración conocida, permite extrapolar la cantidad de proteína de las muestras, enfrentando las absorbancias que determinamos en el espectrofotómetro (595 nm) frente a las concentraciones conocidas de la recta. Las concentraciones utilizadas en la recta fueron 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml y 25 µg/ml, y la proteína utilizada albúmina de suero bovina (BSA).

A continuación se realizó la inmunoprecipitación de la proteína utilizando Proteína Sepharosa (30 µl por cada muestra). Para ello la noche previa al experimento el volumen de sepharosa deseado se lavó tres veces en PBS frío, se resuspendió en PBS (entre 50-100 µl por

muestra) y se le añadió el anticuerpo (GHR; JAK2, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA; STAT5, Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA), 1µg por muestra. La mezcla se dejó rotando toda la noche a 4 °C en un agitador orbital, para favorecer el conjugado entre la proteína sepharosa y el anticuerpo.

Al día siguiente, el conjugado se lavó 3 veces en PBS y se resuspendió en la solución de lisis. Volúmenes iguales del conjugado se mezclaron junto con la cantidad de proteína deseada obtenida de los lisados celulares. La mezcla se dejó incubando toda la noche a 4 °C en un agitador orbital para favorecer la unión entre el anticuerpo y la proteína a reconocer.

Realizada la inmunoprecipitación, las muestras se centrifugaron 3 minutos a 14000 rpm 4 °C y se desechó el sobrenadante. Posteriormente la mezcla de sepharosa + anticuerpo + proteína se lavó 3 veces con una solución de lavado, que consiste en la solución de lisis pero sin los inhibidores de proteasas (500 µl), se centrifugó a 14000 rpm 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces más.

Por último, se resuspendieron las muestras en tampón de electroforesis (1x) con β-mercaptoetanol para desnaturalizar las muestras hirviéndolas durante 5-10 minutos. Este proceso permite la separación de la proteína del conjugado de sepharosa, además de la pérdida de la estructura tridimensional de la proteína dando lugar a proteína lineal.

Las muestras se separaron en un gel de electroforesis 10% SDS-PAGE (10% acrilamida, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% Amonipersulfato y Temed) a 90 voltios durante aproximadamente 2.5 horas. A continuación, la proteína se transfirió a membranas de nitrocelulosa (BioRad Laboratorios, Hercules, CA, USA) durante 1 hora a 250 mA, que fueron posteriormente incubadas para su bloqueo durante 1 hora en TBS-T (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl y 0.1% Tween 20) con 4% BSA.

Seguidamente, las membranas se incubaron durante 1 hora con TBS-T conteniendo 1% BSA y un anticuerpo anti-fosfotirosina (α-pTyr, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), que reconoce los residuos proteicos fosforilados en tirosina. Tras la incubación con el primer anticuerpo se lavaron las membranas durante 1 hora en TBS-T, y se incubaron otra hora con TBS-T con 1% BSA y con anticuerpos secundarios anti-IgG conjugados con peroxidasa

(Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania). Se volvió a lavar las membranas y por último se visualizó la proteína utilizando un sistema de detección quimioluminiscente ECL (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania). Las superficies de las membrana secas, donde están las proteínas, se pusieron en contacto con el reactivo ECL durante 1 minuto (mezcla 1:1 del reactivo 1 y 2), lo que produjo una señal quimioluminiscente que quedó impresa sobre placas de autorradiografía al introducir las membranas en un cassette de autorrevelado.

Para la realización de un control de carga entre las distintas calles, las membranas se incubaron con los anticuerpos utilizados anteriormente para la inmunoprecipitación:  $\alpha$ -GHR,  $\alpha$ -JAK2 y  $\alpha$ -STAT5.

Las membranas se limpiaron de los anticuerpos unidos anteriormente, para lo que se utilizó una solución denominada “Stripping” (100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% SDS y 62.5 mM Tris pH 6.7). Se realizó una incubación de las membranas con la solución en un baño a 55 °C durante 30 minutos con agitación ocasional, para favorecer la desunión entre las proteínas fijadas a la membrana y los anticuerpos que las reconocen.

El paso siguiente fue bloquear de nuevo las membranas en TBS-T con 4% de BSA durante 1 hora, e incubarlas con los anticuerpos  $\alpha$ -GHR (0.1  $\mu$ g/ml),  $\alpha$ -JAK2 (1/2500),  $\alpha$ -STAT5 (1/1000) diluidos en TBS-T con 1% BSA durante 1 hora. A continuación se lavaron en TBS-T y se incubaron otra hora con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa. Pasada la hora se lavaron nuevamente y se realizó el revelado con ECL como se describió anteriormente.

En el caso del estudio de p38 MAPK, el protocolo de Western Blot utilizado fue el mismo que el descrito anteriormente excepto la inmunoprecipitación, que no se realizó. Brevemente, tras la lisis se cuantificó la proteína total y directamente se separó en geles de acrilamida, para la posterior transferencia a membranas de PVDF (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania) e incubación con los anticuerpos. Primeramente se incubó con un anticuerpo anti-fosfotirosina (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), y a continuación con un anticuerpo anti-p38 MAPK (1:200) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO,

USA), de forma que se determinó el estado de fosforilación de la proteína con los distintos tratamientos.

## **2.8. Técnicas para la detección de apoptosis**

### **2.8.1. Citometría de flujo**

Esta técnica permitió realizar un análisis del ciclo celular de la línea de cardiomiocitos HL-1 tras su tratamiento con GH. El objetivo fue determinar el efecto de la GH sobre la apoptosis inducida por AraC, así como el papel de la fosfatasa calcineurina en este efecto, mediante la utilización de inhibidores específicos de la misma (ciclosporina A y FK-506) (Kakita T et al. 2001).

Para ello  $10^6$  células sembradas en flask de  $25\text{ cm}^2$  se privaron de suero durante 12 horas en medio ExCell A+B (JRH Biosciences, Andover, Reino Unido). Durante este período, las células estuvieron en presencia o ausencia de  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  de GH, y en presencia o ausencia de ciclosporina A ( $3\text{ }\mu\text{M}$ ) + FK-506 ( $150\text{ ng/ml}$ ), inhibidores específicos de la fosfatasa calcineurina. Posteriormente se realizó el tratamiento durante 24 horas con el agente pro-apoptótico AraC a una dosis  $100\text{ }\mu\text{M}$ .

Los inhibidores de la fosfatasa calcineurina permitieron determinar si un posible efecto de la GH sobre la apoptosis cardiomiocitaria, podría ser a través de la vía de señalización de esta proteína.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se despegaron de la superficie de cultivo utilizando una solución de tripsina-EDTA (Life Technologies Ltd. Poole, UK), se recogieron en 10 ml de medio DMEM con 10% de FBS, y se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos a  $23\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$ . A continuación el pellet celular se disgregó y lavó en 1ml de tampón PBS, y las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Una vez fijadas se incubaron toda la noche en etanol al 70% frío a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Al día siguiente las células se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos a  $23\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$ , se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1ml de una solución de PBS con  $1\text{ mg/ml}$  de ARNasa y  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propídido, donde se dejó incubando 1 hora. El yoduro de propídido se intercala entre el ADN, lo que permite determinar la cantidad y calidad del ADN presente en la célula en dicho momento, así como la

clasificación de éstas en las distintas fases del ciclo celular. Tras la incubación, la suspensión celular se analizó por citometría de flujo en un FACSCALIBUR (Becton & Dickinson, San José, CA, USA), utilizando el programa Cell Quest. La apoptosis se determinó como el porcentaje de ADN en el pico hipodiploide (sub-G0/G1).

### **2.8.2. Análisis de la fragmentación del ADN por electroforesis o “DNA ladder”**

Este ensayo permitió determinar la presencia o no de apoptosis en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo primario. La inducción de la apoptosis en este modelo celular consistió en la privación de suero durante 48 horas en medio DMEM. Para estudiar el efecto de la GH sobre la apoptosis inducida, las células se mantuvieron durante 36 horas en cultivo, tiempo tras el que se privaron de suero durante 48 horas en presencia o ausencia de 1 µg/ml de GH recombinante humana (Saizen, Serono, Madrid, España).

Para este ensayo se utilizaron  $5 \times 10^5$  células por tratamiento, sembradas sobre placas de 6 pocillos. Pasado el tiempo de estimulación, las células se lavaron en PBS, se transfirieron a tubos de polipropileno de 1.5 ml, y se centrifugaron a 3000 rpm 2 minutos. A continuación el precipitado celular se lisó en aproximadamente 150 µl de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM pH 8.0 y 0.1% (p/v) SDS), posteriormente se añadieron 300 µg de proteinasa K (Life Technologies Ltd. Poole, UK), y se dejó incubar los lisados a 65 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo el ADN se desproteinizó mediante una extracción fenol, fenol:cloroformo y cloroformo según se describió en el apartado “Extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico”. El ADN se precipitó con 3 M acetato sódico pH 5.3, se lavó con etanol 70%, se secó al aire y se resuspendió en una solución acuosa con 0.1 mg/ml de ARNasa A (Life Technologies Ltd. Poole, UK).

La electroforesis se realizó cargando 2 µg de ADN por calle en geles del 1% de agarosa en tampón 0.5x TBE (45 mM Tris-HCl pH 8.0, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8.0) durante aproximadamente 90 minutos a 90-100 voltios. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron en agua con bromuro de etídio durante 5 minutos, se lavaron en agua durante 15-20 minutos y se examinaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta.

### 2.8.3. Ensayo TUNEL

Este ensayo se realizó para determinar la apoptosis en cardiomiocitos neonatales de rata y en células HL-1. En el primer caso, los cardiomiocitos neonatales se privaron de suero durante 48 horas en medio DMEM. Durante este tiempo, las células se mantuvieron en presencia o ausencia de GH a una dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$ . En los ensayos con la línea HL-1, las células se mantuvieron durante 12 horas en medio de serodeprivación ExCell A+B (JRH Biosciences, Andover, Reino Unido). Durante este período estuvieron en presencia o ausencia de 1  $\mu\text{g/ml}$  de GH, y en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-IGF-1 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, USA), capaz de bloquear la acción de IGF-1 (Baixeras E et al. 2001). A continuación, se trataron durante 12 horas a una dosis 100  $\mu\text{M}$  del agente pro-apoptótico AraC.

La utilización del anticuerpo anti-IGF-1 permitió determinar si el posible efecto de la GH sobre la apoptosis de los cardiomiocitos, era directo o mediado por IGF-1.

Para realizar el experimento,  $2 \times 10^4$  células se sembraron sobre cubreobjetos situados en los pocillos de placas de 24 tratados con fibronectina. Transcurrido el tiempo de tratamiento, los cubreobjetos se recogieron y se lavaron con tampón PBS. A continuación las células se incubaron durante 2 horas con la solución de marcaje en una cámara húmeda dentro del incubador de células. La solución de marcaje utilizada pertenece a In Situ Cell Death Detection Kit (Fluoresceína) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), y consistió en una polimerasa diluida en un tampón en presencia de nucleótidos marcados con fluoresceína. Este enzima es capaz de polimerizar nuevo ADN a partir de las partes terminales de los fragmentos presentes en la célula apoptótica. De esta forma, cuanto mayor sea el grado de apoptosis, más extremos terminales aparecen y mayor será la fluorescencia incorporada. Para la incubación se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de la solución de marcaje sobre parafilm situado encima de papel húmedo dentro de una placa de cultivo (cámara húmeda). En contacto con la solución se colocó la cara de los cubreobjetos sobre la que se sembraron las células y se dejó incubar. Posteriormente se recogieron los cubreobjetos, se lavaron en PBS, 3 lavados de 5 minutos, y se fijaron las células

durante 4 minutos en paraformaldehído sobre hielo. Nuevamente se realizaron 3 lavados de 5 minutos en PBS. Por último se pasaron por etanol, se secaron y se montaron sobre portaobjetos utilizando pegamento para inmunofluorescencia. Los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus X-FLA (Olympus Optical, Hamburg, Alemania).

#### **2.8.4. Tinción vital Hoechst**

La tinción vital Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) está basada en la incorporación de éste colorante al núcleo celular. La entrada de una célula en apoptosis supone una serie de cambios morfológicos entre los que está una alteración de la estructura nuclear y cambios en la condensación del ADN. En función de si la célula está sufriendo o no apoptosis, la condensación de la cromatina tendrá lugar o no, y la incorporación de la tinción será mayor o menor. Así, los núcleos apoptóticos se teñirán de azul brillante, mientras que los no apoptóticos de azul pálido. Esto depende del agente colorante bisbenzidina, que se introduce en el ADN entre las bases adenina-timina, y que al ser observado bajo luz ultravioleta confiere un color azul brillante al núcleo celular apoptótico.

Esta técnica se aplicó tanto a cultivo primario de cardiomiocitos de rata como a la línea celular HL-1. En el primer caso, los cardiomiocitos neonatales se privaron de suero durante 24 y 48 horas en medio DMEM. Durante estos tiempos, las células se mantuvieron en presencia o ausencia de GH a una dosis de 1 µg/ml. Por otro lado, los cardiomiocitos HL-1 se privaron de suero durante 12 horas en medio ExCell A+B (JRH Biosciences, Andover, Reino Unido). Durante este período estuvieron en presencia o ausencia de 1 µg/ml de GH, y en presencia o ausencia de ciclosporina A (3 µM) + FK-506 (150 ng/ml) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). A continuación, se realizó la administración de AraC durante 24 horas, a una dosis 100 µM.

Para ello, 10<sup>4</sup> células de cultivo primario y HL-1 se sembraron sobre placas de 24 pocillos. Finalizados los tiempos de tratamiento las células se incubaron con la solución Hoechst 33258 (5 mM) durante 45 minutos a 37 °C dentro del incubador de células, en un volumen de 250 µl de medio DMEM o ExCell A+B, dependiendo del tipo celular, junto con tampón HEPES pH 7.8 a una concentración final 20 mM. Éste permite permeabilizar las

membranas celulares y la incorporación por lo tanto de la tinción. Los pocillos se lavaron dos veces con PBS (500  $\mu$ l) y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos en oscuridad. Tras esto las células se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus X-FLA (Olympus Optical, Hamburg, Alemania).

## **2.9. Ensayo de proliferación MTT**

Este ensayo permite determinar la actividad metabólica de las células en función de una reacción colorimétrica. Para ello se utiliza el MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y1]-2,5-difeniltetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), una sal de color amarillo que la célula metaboliza mediante acción de la deshidrogenasas mitocondriales. La metabolización de esta sal supone la formación de unos cristales denominados formazan que presentan un grupo diazónico que absorbe la luz a 550 nm. La metabolización de MTT a formazan solo va a tener lugar en las células vivas, y supone un cambio de color de amarillo a violeta. La solubilización de los cristales de formazan resultará en una solución coloreada que puede ser analizada mediante un espectrofotómetro. Un incremento en el número de células vivas supone un aumento en la actividad total de las deshidrogenasas mitocondriales. Este aumento se correlaciona directamente con la cantidad de formazan violeta formado.

Realizado sobre la línea celular HL-1. Este ensayo trató de determinar la existencia de un posible efecto de la administración de los inhibidores de calcineurina sobre la proliferación de los cardiomiocitos.

Los cardiomiocitos HL-1 se privaron durante 12 horas en medio ExCell A+B. Transcurrido este tiempo, las células se trataron durante 48 horas con 10% de FBS, con la mezcla de inhibidores de calcineurina ciclosporina A (3  $\mu$ M) y FK-506 (150 ng/ml), o con la mezcla de inhibidores y un 10% de FBS.

Para el desarrollo del ensayo,  $10^4$  células HL-1 se sembraron en placas de 96 pocillos para alcanzar una densidad de 85-90%. Cada uno de los puntos del experimento se sembró por triplicado, es decir, tres pocillos por tratamiento realizado. Transcurridas las 12 horas de serodeprivación, se trataron las células. El volumen de tratamiento fue de 100  $\mu$ l por pocillo. 4

horas antes de la conclusión de los tratamientos, 10  $\mu$ l de la sal MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y1]-2,5-difeniltetrazolium bromide) se añadieron a cada uno de los pocillos, de forma que la concentración final de la sal fue de 0.5 mg/ml (Stock: 5 mg/ml). Se dejó incubar dentro del incubador de células a 37 °C hasta que se cumplió el tiempo de tratamiento estipulado. En ese momento se añadieron 100  $\mu$ l de agente solubilizante (SDS 10% en una solución de HCl 0.01 M), y se dejó en el incubador durante toda la noche. Al día siguiente, se determinaron los valores de absorbancia mediante la lectura en un lector de ELISA a una longitud de onda de 550nm.

### **2.10. Radioinmunoensayo de IGF-1**

Los niveles de IGF-1 se determinaron en los medios de cultivo obtenidos del cultivo de células HL-1. Estos medios pertenecen a células deprivadas de suero durante 12 horas y tratadas con AraC (100  $\mu$ M) durante otras 12 horas. Para testar el efecto de la GH sobre la secreción de IGF-1 por parte de los cardiomiocitos, un grupo de células se pretrató 12 horas con GH antes del tratamiento con AraC. La determinación de los niveles de IGF-1 se realizó mediante la utilización de un kit de radioinmunoensayo (DRG Diagnostics, Marburg, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Previamente a la realización del ensayo se hizo una extracción de las muestras según el protocolo del kit. Por cada muestra se pipetearon en un tubo de polipropileno 50  $\mu$ l a los que se les añadió 200  $\mu$ l de la solución de extracción. Los tubos se agitaron e incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron a más de 10000 rpm 3 minutos a 25 °C. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo donde se mezcló con 500  $\mu$ l de la solución de neutralización. Esta muestra neutralizada es la que se usó en el ensayo.

Los estándares son concentraciones crecientes de la proteína que van desde una concentración de 160 ng/ml hasta 4000 ng/ml. Con los valores de radiactividad obtenidos de estos puntos, se construyó la curva a partir de la cual determinar las concentraciones de IGF-1 en los medios de cultivo; mediante interpolación de los valores obtenidos de las muestras. Los controles utilizados por el kit son 2, uno con elevados niveles de IGF-1 y otro de niveles bajos.

Estos controles nos permiten determinar la eficiencia del ensayo, ya que los valores que se obtienen a partir de ellos tienen que estar dentro de un rango determinado por el fabricante.

Protocolo del ensayo: Cada uno de los puntos del ensayo se realizó por duplicado. A continuación mostramos un esquema de todos los puntos que incluyeron en el ensayo con las cantidades pipeteadas, así como los reactivos que hay que añadir a cada uno de ellos:

		<b>Reactivo IGF-1 [I-125]</b>	<b>Antisuero IGF-1</b>	<b>Reactivo de precipitación</b>
<b>Cuentas totales (TC)</b>		100 µl		
<b>Unión no específica (NSB)</b>	150µl 0 ng/ml Estándar IGF-1	100 µl		1 ml
<b>Estándares</b>	50 µl Estándares	100 µl	100 µl	1 ml
<b>Controles</b>	50 µl Controles	100 µl	100 µl	1 ml
<b>Muestras (medio de cultivo)</b>	50 µl Muestra	100 µl	100 µl	1 ml

En la primera parte del ensayo se mezclaron 50 µl de los estándares, controles y muestras con 100 µl del reactivo IGF-1 [I-125]. A los puntos TC solo se le añadieron los 100 µl del reactivo IGF-1, mientras que a los puntos NSB se les añadieron 150 µl del estándar 0 ng/ml con 100 µl del reactivo IGF-1. A continuación, a todos los puntos, excepto a los TC y NSB, se les añadieron 100 µl del antisuero IGF-1. La mezcla se agitó y se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente se añadió 1 ml del reactivo de precipitación a todos los tubos excepto a los TC. Los tubos se agitaron y se incubaron durante 20 minutos a 25 °C. Por último se centrifugaron todos los tubos, excepto los TC, a 1500x g 20 minutos, y se decantaron (los TC no) por inversión. La radiactividad asociada se cuantificó en un contador gamma.

### **3. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en este trabajo se expresaron como medias  $\pm$  desviaciones estándar media (SEM).

Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante ANOVA seguido de un test de comparaciones múltiples. Un valor de P menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ) se consideró significativo.

ARNm		Secuencia	Producto (pb)
GHR	Sentido Antisentido	5'-GAGGAGGTGACCACCATCTTGGGC-3' 5'-ACGACCTGCTGGTGTAAATGTC-3'	530
$\beta$ -actina	Sentido Antisentido	5'-TACAACCTCCTTGCAGCTCC-3' 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'	601
IGF-1 clase I-1del (Kamai Y et al. 1996)	Sentido Antisentido	5'- ATGGGGAAAAATCAGCAGTC-3' 5'- AGGTCTTGTTCCTGCAC-3'	450
IGF-1 clase II (Kamai Y et al. 1996)	Sentido Antisentido	5'- CTGCTGTGTAAACGACCCGG-3' 5'-AGGTCTTGTTCCTGCAC-3'	
GAPDH	Sentido Antisentido	5'-TCCATGACAACCTTGGCATCGTGG-3' 5'-GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC-3'	376

**Tabla 1:** Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR, y tamaños de amplificación de los productos obtenidos.

Producto	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Ciclos	Extensión final
GHR	94°/1min	68°/1min	72°/1min	35	72°/10min
$\beta$ -actina	94°/1min	68°/1min	72°/1min	35	72°/10min
IGF-1 clase I-1del	95°/1min	55°/1min	72°/2min	32	72°/10min
IGF-1 clase II	95°/1min	55°/1min	72°/2min	32	72°/10min
GAPDH	95°/1min	55°/1min	72°/2min	32	72°/10min

**Tabla 2:** Condiciones de PCR utilizadas para cada pareja de cebadores.



## **RESULTADOS HORMONA DE CRECIMIENTO**



## 1. Expresión del receptor de GH (GHR) por cardiomiocitos en cultivo primario, y unión ligando-receptor en cardiomiocitos HL-1

La expresión del receptor de GH se analizó en cultivo primario (CP) de cardiomiocitos neonatales de rata mediante RT-PCR, y en la línea celular HL-1 mediante unión específica ligando receptor.

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR mostraron que las células en cultivo primario expresan niveles de ARNm del receptor similares a los observados en corazón de rata adulta. El tejido utilizado como control positivo fue el hígado, ya que es donde se encuentran los mayores niveles del receptor de GH. Esto permitió comprobar como la expresión del receptor en cultivo primario de cardiomiocitos es elevada (Figura 1A). El control interno de la reacción utilizado fue el gen de  $\beta$ -actina. Permite determinar que los niveles de expresión encontrados no se deben a diferencias de carga.

Mediante el análisis *scatchard* se estudiaron las características de la unión entre la GH y su receptor en células HL-1. La utilización de concentraciones crecientes de hormona que van a competir con la hormona marcada por los sitios de unión al receptor, permitió generar una curva de competición a partir de la cual se determinaron la constante de disociación  $K_d$  entre hormona y receptor, la unión máxima  $B_{max}$ , así como una aproximación del número de sitios de unión para la hormona por célula (Figura 1B).

**$K_d$  1.98 nM                       $B_{max}$  0.012 nM                      Sitios de unión 15000**

Los resultados de este análisis mostraron una producción constitutiva eficiente del receptor de GH (GHR) en la superficie celular de cardiomiocitos HL-1. Tanto el ensayo de unión como el *scatchard* se repitieron dos veces obteniendo resultados similares.

## 2. Efecto de la GH en células HL-1 sobre la activación de GHR, JAK2 y STAT5

El tratamiento de la línea celular HL-1 con GH a una dosis 1  $\mu$ g/ml, permitió estudiar si la hormona es capaz de activar a su receptor, así como a moléculas clásicas de la vía de señalización situadas a continuación.

Mediante inmunoprecipitación del receptor y posteriormente análisis del estado de fosforilación de éste por Western Blot, se determinó que 5 minutos de incubación con la hormona son suficientes para activar GHR, produciéndose una fosforilación en tirosina del mismo. Se observó como la fosforilación aún está presente a 15 y 30 minutos, pero la intensidad de la misma decrecía con el tiempo (Figura 2A). En concordancia con este resultado, la inmunoprecipitación de JAK2 y STAT5, así como el Western Blot anti-fosfotirosina, mostraron que la hormona induce activación de estas moléculas ya a 5 minutos, manteniéndose dicha activación a 15 minutos (Figura 2B y C respectivamente). Estas mismas membranas fueron posteriormente incubadas con anticuerpos anti-GHR, anti-JAK2 y anti-STAT5, para confirmar que las cantidades de proteína cargada eran las mismas entre los distintos tiempos de incubación (parte inferior de figuras 2A, B y C).

### **3. Efecto de la GH sobre la apoptosis en cardiomiocitos**

#### **3.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata**

El posible efecto protector de la GH sobre la apoptosis en cardiomiocitos se estudió mediante administración de la hormona a una dosis de 1 µg/ml. Como método de inducción de apoptosis celular se utilizó la deprivación de suero.

Un primer estudio se realizó mediante el análisis de la fragmentación del ADN por la técnica del “DNA ladder” o escalera de ADN. La electroforesis realizada demostró que tras la serodeprivación de las células durante 48 horas, se produjo una fragmentación del ADN característica de la apoptosis. Cuando las células se incubaron ese mismo tiempo pero en presencia de GH, la fragmentación del ADN desapareció, observándose en el gel de electroforesis una sola banda íntegra de ADN (Figura 3A). Estos resultados se corroboraron con la técnica TUNEL, que permite marcar fluorescentemente los extremos terminales de los fragmentos de ADN que se generan durante la apoptosis. Se observó como el marcaje del ADN aparecía claramente con una mayor intensidad en células únicamente serodeprivadas que en células serodeprivadas y tratadas con GH (Figura 3B).

De acuerdo con este resultado, mediante tinción vital Hoechst se determinó que, bajo las mismas condiciones de cultivo, la presencia de la hormona de crecimiento reducía el número

de células apoptóticas. Los experimentos se repitieron por triplicado obteniendo resultados similares. Este efecto se hizo visible a las 24 horas de serodeprivación, siendo más evidente tras 48 horas (Figura 3C).

### 3.2. Línea celular HL-1

El mecanismo utilizado para la inducción de la apoptosis sobre cardiomiocitos HL-1 fue el tratamiento con el citostático AraC (100  $\mu$ M). La elección de este citostático como inductor de apoptosis se basó en datos reflejados en la bibliografía en los que se demuestra que AraC es un agente inductor de apoptosis celular (Geller HM et al. 2001). La dosis utilizada en los experimentos se estableció tras la realización de ensayos dosis-respuesta a partir de dosis de referencia publicadas en la bibliografía.

En un primer momento, los niveles de apoptosis se determinaron a través del estudio del ciclo celular por citometría de flujo. Para ello se realizaron tinciones con yoduro de propidio, capaz de intercalarse en el ADN. Este ensayo mostró como cultivos de células no tratadas presentaban un 9.6% de apoptosis, que se veía incrementado hasta un 21.1% tras la administración de AraC durante 24 horas. El pretratamiento con GH 12 horas antes del tratamiento con AraC, ejerció un efecto reductor de la apoptosis a niveles del 13.9% (Figura 4). Asimismo, también hubo alteraciones en los porcentajes de células presentes en la fase del ciclo celular S/G<sub>2</sub>/M (4n). Cultivos no tratados presentaron un 56.9% de células en esta fase, el tratamiento con AraC redujo esta cifra hasta 36.9%, mientras que el pretratamiento con GH de células tratadas con AraC revirtió este efecto incrementando el porcentaje hasta un 52.8% (Figura 4). Estos resultados ponen de manifiesto que la GH revierte la apoptosis inducida por AraC y modifica las alteraciones inducidas sobre el ciclo celular por este citostático.

Resultados similares se obtuvieron mediante el ensayo TUNEL. Se comprobó como la administración de AraC durante 12 horas indujo un marcado incremento en la apoptosis respecto a células control no tratadas ( $p < 0.01$ ;  $n = 3$ ). Dicho incremento se vio bloqueado por el pretratamiento durante 12 horas con la hormona de crecimiento, de forma que los niveles de apoptosis fueron muy similares a los del grupo control ( $n = 3$ ) (Figura 5A y 5B).

#### **4. Efectos directos de la GH sobre cardiomiocitos HL-1**

Con el objetivo de comprobar si el efecto anti-apoptótico de la hormona de crecimiento sobre cardiomiocitos era directo o mediado por IGF-1, se introdujo en el cultivo un anticuerpo anti-IGF-1 para bloquear el efecto de esta hormona. La administración del anticuerpo a una dosis 10 µg/ml conjuntamente con AraC y GH, no modificó de forma significativa el efecto anti-apoptótico de la hormona, analizado por TUNEL. Los niveles de apoptosis observados fueron muy similares a los obtenidos por el tratamiento conjunto de AraC y GH, como se puede observar en la representación gráfica (n= 3) (Figura 5A), y en las fotografías de fluorescencia representativas de los ensayos (Figura 5B). Este resultado estaría indicando un efecto anti-apoptótico de GH no mediado por IGF-1.

Tales resultados fueron contrastados en una serie de experimentos donde se estudió si el tratamiento con GH era capaz de aumentar la síntesis génica y proteica de IGF-1. Mediante radioinmunoensayo se determinaron los niveles proteicos de IGF-1 en el medio de cultivo de células tratadas 12 horas con AraC, y células pretratadas previamente con GH durante 12 horas. Los resultados obtenidos mostraron una concentración de 83±6 ng/ml en el grupo tratado con AraC y de 96±8 ng/ml en el grupo de AraC + GH, siendo las diferencias estadísticamente no significativas (n= 3). El estudio de expresión génica mediante RT-PCR, permitió determinar los niveles de expresión de las diferentes clases de ARNm de IGF-1, clase I o clase I del y clase II, tras los tratamientos. El análisis estadístico realizado de tres experimentos independientes no encontró diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 6A y 6B).

En conjunto, los datos obtenidos con la utilización del anticuerpo y los obtenidos del estudio de los niveles de expresión génica y proteica de IGF-1, sugieren que el efecto anti-apoptótico de la hormona de crecimiento sobre cardiomiocitos es directo y no mediado por IGF-1.

#### **5. Papel de la calcineurina sobre el efecto de la GH en células HL-1**

El estudio del posible papel que pudiera desempeñar la fosfatasa calcineurina en el efecto anti-apoptótico de la GH se llevó a cabo mediante la utilización de dos inhibidores

específicos de esta proteína: ciclosporina A y FK-506, cuya combinación garantiza un bloqueo de la actividad de dicha enzima.

La administración de ciclosporina A (3  $\mu$ M) y FK-506 (150 ng/ml) conjuntamente con AraC y GH, resultó en una reducción casi total del efecto anti-apoptótico de la hormona de crecimiento. Este hecho se determinó analizando el ciclo celular de las células por citometría de flujo. El tratamiento de las células con AraC indujo apoptosis celular (21.1%), mientras que el pretratamiento con GH la previno (13.9%). Se observó que la administración de los inhibidores, en presencia de AraC y GH, revertía el efecto anti-apoptótico de la GH provocando un aumento en el número de células apoptóticas (21.4%), siendo éste muy similar al obtenido con el tratamiento de AraC solo (Figura 4). Además, con el tratamiento conjunto, también se contrastó que el porcentaje de células en fase S/G<sub>2</sub>/M obtenido (41.6%) era similar al obtenido en el grupo tratado exclusivamente con AraC (36.9%), y claramente inferior al grupo pretratado 12 horas con GH (52.8%) (Figura 4).

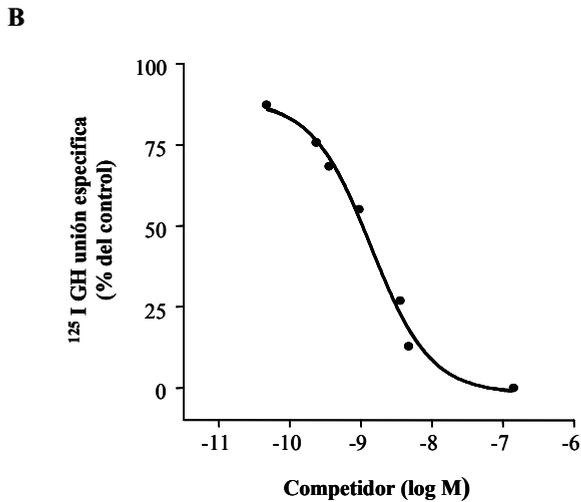
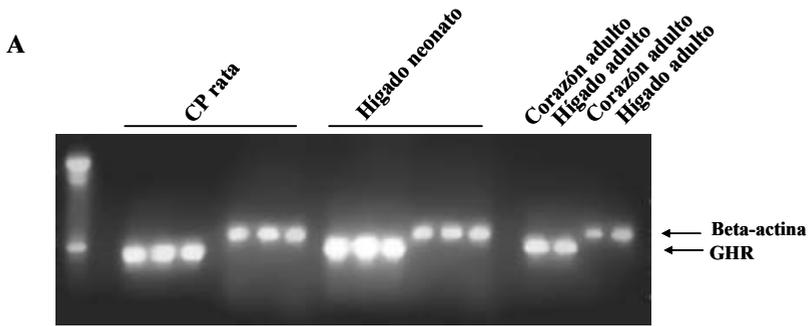
Este efecto bloqueador de los inhibidores sobre la acción de la GH se vio confirmado por ensayos de determinación de apoptosis mediante tinción vital Hoechst (Figura 7A;  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

Una tercera serie de experimentos se realizaron para determinar si realmente el aumento en la incidencia de apoptosis tras la administración de los inhibidores, no era debido a un efecto citotóxico de éstos. Para ello, utilizando la técnica MTT, capaz de determinar actividad mitocondrial y por tanto viabilidad celular, se comprobó que la administración de los inhibidores no alteraba la actividad metabólica de los cardiomiocitos respecto al grupo control. Este mismo ensayo se realizó en presencia de suero (FBS), necesario para la proliferación celular. Los resultados mostraron como la presencia de suero en el medio de cultivo incrementaba de forma estadísticamente significativa la actividad metabólica de los cardiomiocitos respecto a células sin suero; y que la administración conjunta de la combinación de inhibidores de calcineurina no modificó este incremento en la actividad ( $n = 3$ ) (Figura 7B).

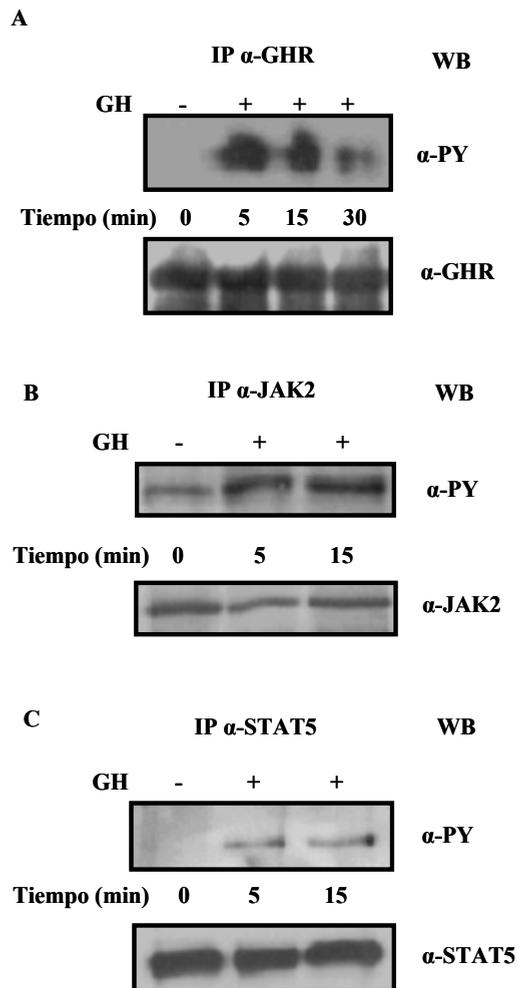
En conjunto, estos resultados estarían sugiriendo que el efecto anti-apoptótico de la GH en cardiomiocitos estaría mediado por la fosfatasa calcineurina.

## **6. p38 MAPK como mediador del efecto de AraC**

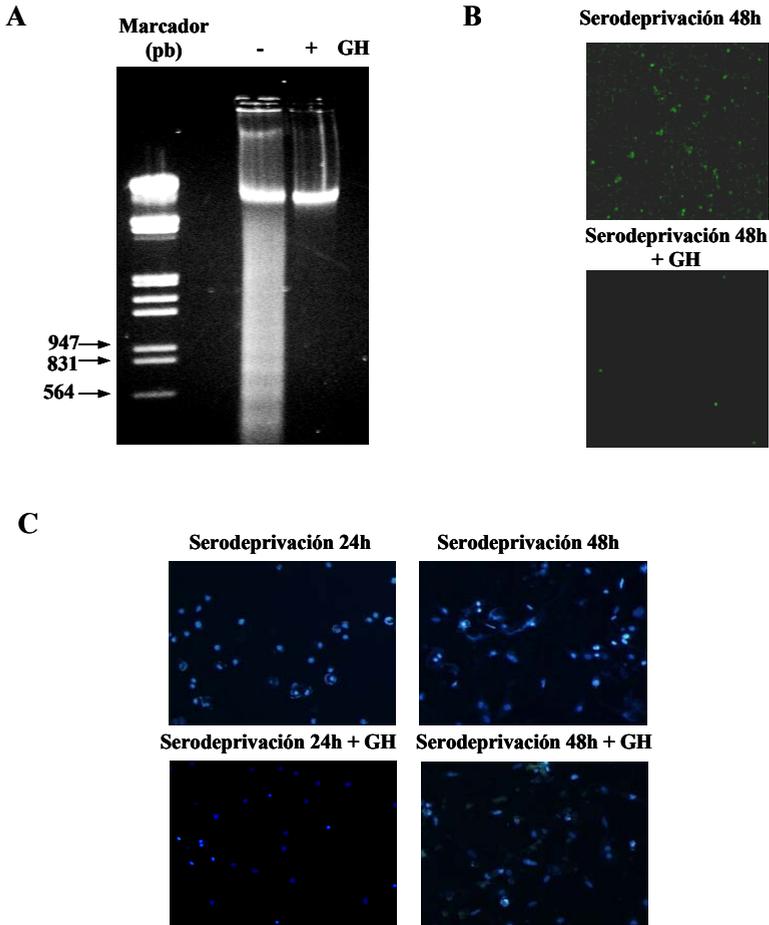
Se planteó estudiar a p38 MAPK como posible mediador de apoptosis en el tratamiento con AraC. Con un anticuerpo anti-fosfotirosina y otro anticuerpo específico anti-p38 se determinó que el tratamiento con AraC durante 24 horas en células HL-1 inducía una fosforilación de p38 MAPK en tirosina. Se comprobó que el pretratamiento con GH de 12 horas era capaz de inhibir de forma parcial el efecto de AraC sobre p38 (Figura 7C). Estos efectos se comprobaron en dos experimentos independientes obteniendo resultados similares.



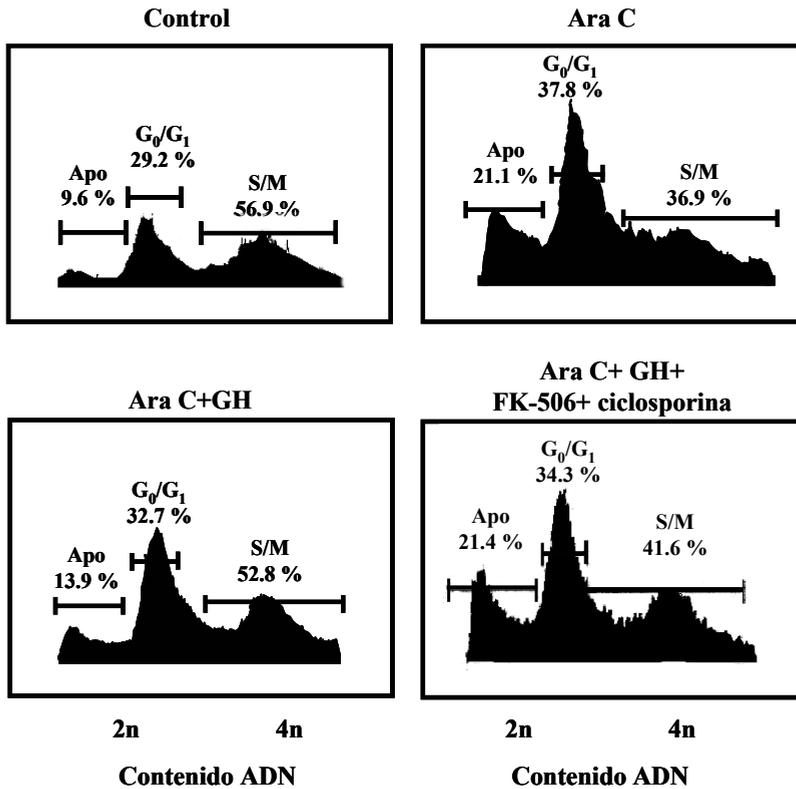
**Figura 1. Panel A.** Determinación por RT-PCR de la expresión génica del receptor de GH (GHR) en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata y en corazón de rata adulta. Se utilizó como control positivo de expresión hígado de neonato de rata e hígado de rata adulta. El gen utilizado como control interno de la reacción fue  $\beta$ -actina. **Panel B.** Curva de competición para el receptor de GH en células HL-1. Resultado de la competición entre GH humana marcada con  $^{125}\text{I}$  y concentraciones crecientes de hormona no marcada, por los sitios de unión al receptor.



**Figura 2.** Activación de GHR, JAK2 y STAT5 por GH en células HL-1. La administración de GH (1  $\mu$ g/ml) activa mediante fosforilación en tirosina (PY), y de forma tiempo dependiente, a su receptor GHR (A), JAK2 (B), y STAT5 (C); analizado mediante inmunoprecipitación (IP) y Western Blot (WB). Las partes inferiores de los paneles muestran los controles de carga realizados sobre los mismos blots utilizando los anticuerpos de las inmunoprecipitaciones. Figura representativa de tres experimentos independientes.

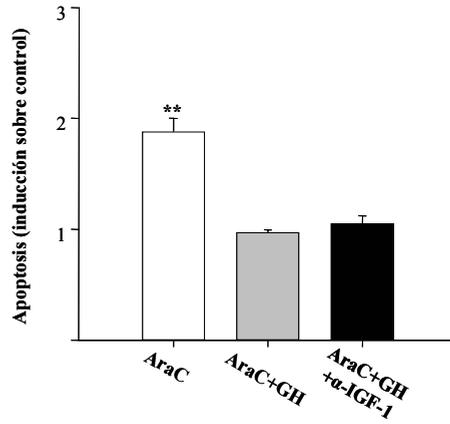


**Figura 3.** Efecto anti-apoptótico de la GH sobre cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel A.** La presencia de GH previno la fragmentación de ADN característica de procesos apoptóticos. **Panel B.** Fotografías representativas de la incidencia de apoptosis, inducida por privación de suero durante 48 horas, en presencia o ausencia de GH; imágenes de fluorescencia obtenidas mediante TUNEL. **Panel C.** Análisis mediante tinción Hoechst de la incidencia de la apoptosis celular inducida por serodeprivación durante 24 o 48 horas en presencia o ausencia de GH. Las fotografías (200x) muestran campos de células representativas de tres experimentos independientes. Se observa una mayor intensidad de fluorescencia en los núcleos donde aparece fragmentación nuclear.

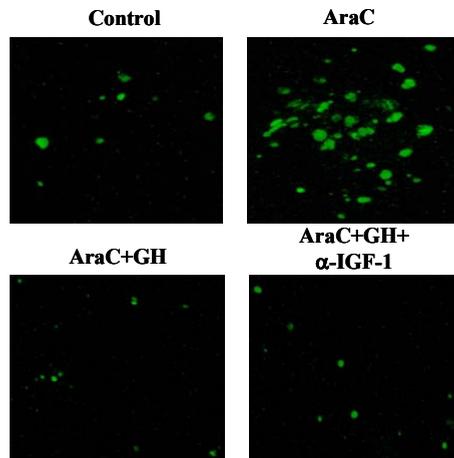


**Figura 4.** Efecto de la hormona de crecimiento y la combinación de inhibidores de la calcineurina (ciclosporina A y FK-506), sobre el ciclo celular de cardiomiocitos HL-1. La adición del citostático AraC durante 24 horas se utilizó como inductor de apoptosis. El pretratamiento con GH, en presencia o ausencia de los inhibidores, se realizó 12 horas antes del tratamiento con AraC. Las gráficas muestran el contenido celular de ADN determinado por citometría de flujo. Se muestran los porcentajes correspondientes al número de células en cada fase del ciclo celular, apoptosis (apo), fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (2n), y fase síntesis/mitosis (S/M) (4n). Se muestra un experimento representativo de una serie de tres experimentos independientes.

A

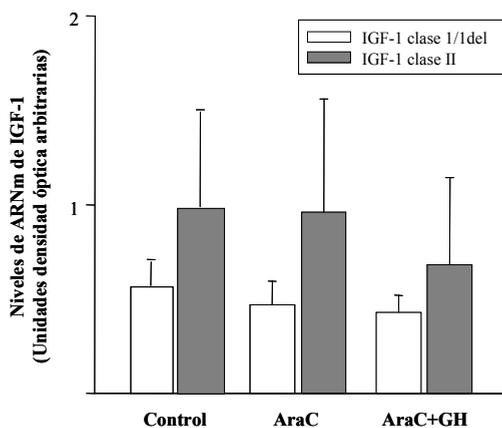


B

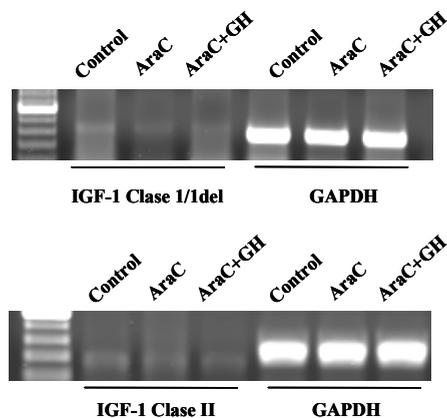


**Figura 5.** Acción anti-apoptótica de la GH sobre la apoptosis inducida en células HL-1. **Panel A.** Análisis estadístico de la apoptosis de tres experimentos independientes, determinada mediante TUNEL. La administración de AraC durante 12 horas incrementa de forma significativa los niveles de apoptosis (\*\*,  $p < 0.01$ ). El pretratamiento durante 12 horas con GH revierte la apoptosis a niveles del control, independientemente de la presencia de 10  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo anti-IGF-1. Los resultados muestran incidencia de apoptosis respecto al control. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM. **Panel B.** Fotografías de fluorescencia representativas de los experimentos de TUNEL.

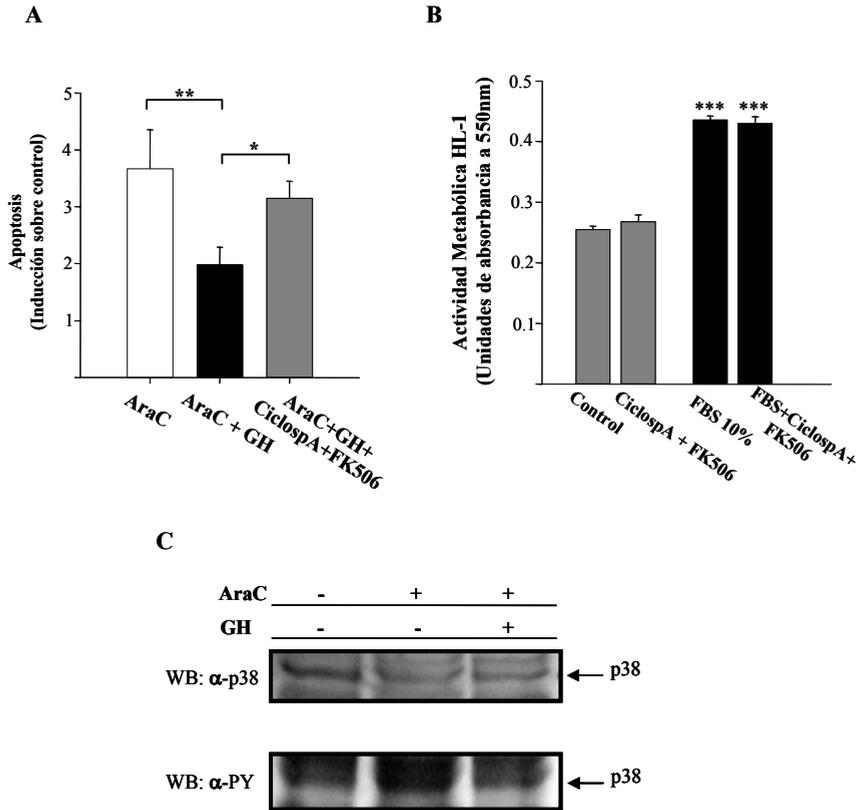
A



B



**Figura 6.** Efecto de la administración de GH sobre la expresión génica de IGF-1. **Panel A.** Análisis estadístico de la cuantificación por RT-PCR de la expresión del ARNm de IGF-1 (clase 1/1del y clase II) en células HL-1 tratadas con AraC, en presencia o ausencia de pretratamiento con GH (tres experimentos independientes). No se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  SEM. **Panel B.** Las imágenes muestran geles de agarosa de las diferentes clases de ARNm de IGF-1, representativos de los experimentos de RT-PCR.



**Figura 7. Panel A.** Representación estadística de la apoptosis cuantificada por tinción vital Hoechst en células HL-1. Tratamiento con AraC durante 24 horas en presencia o ausencia de pretratamiento con GH (12 h) y de la combinación de inhibidores de calcineurina ciclosporina A y FK-506 (12 h). Los resultados muestran la incidencia de apoptosis respecto al control. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  ( $n = 3$ ). **Panel B.** Efecto del tratamiento durante 48 horas con inhibidores de calcineurina sobre la viabilidad de células HL-1, analizado por MTT. El tratamiento no afectó a la viabilidad celular. \*\*\*,  $p < 0.001$  ( $n = 3$ ). **Panel C.** Mediante Western Blot (WB) se determinó que el pretratamiento con GH durante 12 horas ejerció un efecto preventivo parcial de la fosforilación de p38 MAPK inducida por el tratamiento durante 24 horas con AraC. Experimento realizado dos veces.



## **DISCUSIÓN HORMONA DE CRECIMIENTO**



En este trabajo se ha estudiado el posible papel regulador de la hormona de crecimiento sobre la supervivencia de los cardiomiocitos. Esta hipótesis de trabajo se planteó en función del papel relevante que la GH tiene sobre el buen funcionamiento cardiovascular, ya que alteraciones de su secreción se asocian a diversas anomalías cardiovasculares (Saccá L et al. 1994). Además, la idea de la GH como agente regulador de apoptosis cardiomiocitaria se apoyó también en otra serie de evidencias. La primera es el hecho de que algunas de las ya mencionadas sustancias (hormonas, citoquinas y factores de crecimiento) capaces de actuar como factores de supervivencia, realizan su acción a través de receptores de la superfamilia de citoquinas, en la cual está incluido el receptor de GH (GHR) (Horseman ND & Yu-Lee LY. 1994). La segunda viene dada por la demostración de que la GH es capaz de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Haeffner A et al. 1997, Adamopoulos S et al. 2002), las cuales contribuyen en la progresión de la insuficiencia cardíaca aumentando la incidencia de apoptosis (Aukrust P et al. 2005). Una tercera, es la existencia de diversos trabajos donde se demuestra que la GH está ejerciendo un papel regulador de la apoptosis en distintos tipos celulares. Este papel regulador va a depender del tipo celular, y posiblemente del estado en el que se encuentra la célula. Finalmente, la última evidencia es que la GH tiene efectos sobre la supervivencia y proliferación celular en otros tejidos (Baixeras E et al. 2001, Scheepens A et al. 2001).

Los efectos beneficiosos de la GH a nivel cardiovascular están muy contrastados. Por ejemplo, existen modelos experimentales de insuficiencia cardíaca en los que la GH ha mostrado efectos beneficiosos. Otro ejemplo es el trabajo presentado por Fazio S et al. (1996), en el que se mostró que el tratamiento con GH durante tres meses a pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática e insuficiencia cardíaca, tenía efectos beneficiosos claros. De la misma manera, se demostró que la administración de GH a ratas justo tras el infarto, redujo el tamaño de éste y aumentó la supervivencia de los animales (Jin H et al. 2002); y que dicha administración a ratas con insuficiencia cardíaca post-infarto prolongó la supervivencia de éstas atenuando la apoptosis cardiomiocitaria (Cittadini A et al. 2003). También se han relatado efectos hemodinámicos beneficiosos de la GH, así por ejemplo, pacientes con insuficiencia

cardíaca debido a cardiomiopatía dilatada o isquémica, presentaron mejoría en parámetros hemodinámicos tras la infusión de GH a corto término (Volterrani et al. 1997). Otro ejemplo de efectos beneficiosos de la GH vendría representado por los estudios de terapia de reemplazamiento que se han llevado a cabo en pacientes GH deficientes.

Por otro lado, la hormona de crecimiento se ha mostrado como un regulador de inflamación, modificando los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Adamopoulos S et al. 2002, Adamopoulos S et al. 2003). El proceso inflamatorio juega un papel importante en la patogénesis y progresión de la insuficiencia cardíaca. Se ha observado que la administración de GH a pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática es capaz de reducir los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias, el sistema soluble Fas/FasL (mediadores de apoptosis) (Adamopoulos S et al. 2002), y moléculas de adhesión solubles (Adamopoulos S et al. 2003).

Partiendo de la base de que la hormona de crecimiento interviene de forma directa sobre la regulación del funcionamiento cardíaco en general, y de que muchos de sus efectos a este nivel, en condiciones no alteradas de su secreción, son favorables, se trató de comprobar si la hipótesis anteriormente planteada sobre si la GH es capaz de regular la supervivencia de los cardiomiocitos, era cierta.

La validación de dicha hipótesis de trabajo se desarrolló utilizando como modelos experimentales dos tipos de cultivos *in vitro* de cardiomiocitos, el cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata y la línea celular de ratón HL-1. Se trata de dos modelos de cardiomiocitos que han sido utilizados por distintos grupos para el estudio de la biología cardiomiocitaria. El cultivo primario de cardiomiocitos neonatales es un sistema con el que se viene trabajando desde la década de los años 80, y que ya se ha utilizado para estudios del papel del eje GH/IGF-1 en el corazón (Ito H et al. 1993). La línea celular HL-1 fue desarrollada por Claycomb WC en el año 1998 (Claycomb WC et al. 1998), y desde entonces han aparecido publicados varios trabajos que la han utilizado como modelo experimental de cardiomiocitos *in vitro*. Los temas abarcados en estos trabajos son bastante diversos. Así, se incluyen estudios clásicos sobre la función del cardiomiocito dentro de los que estarían estudios de señalización, regulación eléctrica, metabólica y transcripcional. Pero esta línea celular también se ha utilizado

para desarrollar estudios bajo condiciones patológicas como hipoxia, hiperglucemia-hiperinsulinemia, apoptosis e isquemia reperfusión. Parte de los trabajos más recientes se revisaron en el año 2004 por White SM et al.

La primera aproximación realizada en estas células fue el estudio de la expresión del receptor de GH. Los resultados obtenidos por RT-PCR en el cultivo primario, mostraron la expresión génica del receptor en las células, y que esta expresión aparecía a niveles similares a los presentes en el corazón adulto. En el año 2001, Lu C et al., publicaron un trabajo en el que comparaban la expresión de GHR en células aisladas neonatales frente a corazón total, y observaban una disminución en la expresión del ARNm del receptor en los cardiomiocitos aislados. La disparidad entre este estudio y nuestros resultados no parece tener una explicación clara, pero una interpretación posible sería que las diferencias existentes entre ambos protocolos de cultivo podrían estar afectando a la expresión del receptor. En lo que a la línea celular se refiere, el estudio de unión específica entre ligando y receptor permitió comprobar la presencia del GHR en las células HL-1. Además, mediante el análisis scatchard se determinó una  $K_d$  de 1.98 nM y una densidad de aproximadamente 15000 sitios de unión para GH en cada célula. Ambos resultados, tanto los obtenidos para el cultivo primario como para la línea celular, muestran que los modelos experimentales elegidos para el estudio serían adecuados.

Una vez determinada la presencia del receptor de GH en las células, se pasó a comprobar si la hormona era capaz de poner en marcha a las vías bioquímicas clásicas de señalización que median las acciones biológicas de la GH. Este trabajo se desarrolló en la línea celular HL-1. Habitualmente, la GH se une al dominio extracelular de dos moléculas de receptor lo que deriva en la homodimerización del receptor de forma secuencial. La interacción GH/GHR va a desencadenar la activación de la tirosina quinasa JAK2, la cual se fosforila y activa su dominio quinasa (Zhu T et al. 2001). La activación de dicho dominio produce la fosforilación del GHR, de forma que éste evidencia una serie de lugares de unión para diversas proteínas, entre las que se encuentran las proteínas STAT (Kelly PA et al. 2001). Esta familia de proteínas va a ser una de las principales vías de señalización de la hormona. Aunque su papel fisiológico no es del todo claro, esta familia de factores de transcripción participa en una serie

de eventos celulares como proliferación, diferenciación, supervivencia celular, apoptosis y angiogénesis; y más recientemente se ha descrito su participación en procesos de tumorigénesis (Calo V et al. 2003). Los resultados obtenidos en el trabajo mostraron que GH era capaz de inducir la fosforilación en tirosina de GHR, JAK2 y STAT5, comprobando así el funcionamiento e integridad de esta vía de señalización en cardiomiocitos HL-1.

Tras la demostración de que nuestro sistema experimental tiene receptores para GH, y que éstos son funcionales ya que la administración de la hormona pone en marcha mecanismos clásicos de transducción de la señal hormonal, se pasó a estudiar el efecto de la GH como regulador de apoptosis en cardiomiocitos. Los primeros resultados obtenidos con el cultivo primario demostraron que la GH era capaz de inhibir la apoptosis inducida por privación de suero. Los ensayos de apoptosis, observación de la fragmentación del ADN por electroforesis, TUNEL, y tinción vital Hoechst, demostraron como la presencia de la hormona en el medio de cultivo era capaz de proteger a las células. La privación de suero durante 24 horas fue capaz de inducir la apoptosis celular, la cual tuvo mayor incidencia cuando el tiempo se aumentó hasta 48 horas. Sin embargo, la sola presencia de la hormona en el medio de cultivo, fue capaz de inhibir el efecto apoptótico de la privación, demostrándose así un efecto protector. Los resultados obtenidos con la línea celular HL-1 coincidieron con los obtenidos en el cultivo primario. En este caso la apoptosis inducida por el citostático AraC fue revertida por el pretratamiento durante 12 horas con la GH. Mediante citometría de flujo, se determinó como el pretratamiento con la hormona redujo los porcentajes de células apoptóticas obtenidos con el tratamiento con AraC. Asimismo, el ensayo TUNEL mostró que la rotura del ADN inducida por el citostático, se previno con la presencia de la hormona de crecimiento en el medio de cultivo. Estas evidencias suponen que la GH ejerce un efecto protector sobre la apoptosis inducida en cardiomiocitos.

En la línea de estos resultados que sostienen un efecto protector de la GH sobre la apoptosis, existen otros autores que sugieren que esta hormona regula estos procesos en otros tipos celulares. Algunos trabajos reflejados en la bibliografía hablan de un efecto anti-apoptótico de la hormona: resultados obtenidos en un trabajo realizado con células de leucemia

humana (HL-60) y células de ovario de hámster chino (CHO) mostraron la capacidad de la GH de inhibir la apoptosis inducida por serodeprivación (Costoya JA et al. 1999). La incubación de las células HL-60 con un anticuerpo anti-GH promovía la muerte celular, que se veía disminuida en presencia de suero preinmune. Al tratar estas células con GH la supervivencia celular claramente aumentaba. Por su lado, la deprivación de suero de células CHO resultaba en una inducción rápida de apoptosis, efecto que se veía reducido al incubar con la hormona. En este mismo sentido, se mostró un efecto beneficioso de la hormona sobre monocitos (Haeffner A et al. 1999). Un efecto regulador de la GH sobre este tipo celular ya había sido demostrado, lo que llevó a los autores a estudiar el efecto de la GH sobre la apoptosis mediada por Fas. Estos ensayos demostraron que la GH ejerce un efecto protector sobre monocitos a través de una vía dependiente de Bcl-2. Asimismo, se encontró este efecto protector sobre células de granulosa bovina en cultivo, donde GH disminuía de forma significativa la incidencia de apoptosis (Sirotkin AV & Makarevich AV. 1999), y sobre células linfoides Ba/F3 (células pro B), a las que se indujo la apoptosis por ausencia de interleuquina 3 y suero (Jeay S et al. 2000). Se comprobó que estas células Ba/F3 eran capaces de sintetizar GH, lo que sugería que la GH endógena estaba actuando de forma autocrina/paracrina sobre la supervivencia celular. Además, la adición de un antagonista de la GH promovía la apoptosis de las mismas. También se comprobó que GH protegía frente a daño celular inducido por radiación sobre células de la mucosa intestinal de ratas (Mylonas PG et al. 2000), y sobre linfocitos humanos de sangre periférica (Lempereur L et al. 2003). Los grupos de animales a los que se les administraba la radiación conjuntamente con un tratamiento con GH o IGF-1, presentaban unos niveles de apoptosis similares a los controles no irradiados. Por tanto el tratamiento con GH era capaz de inhibir las lesiones histológicas inducidas por la radiación, manteniendo la integridad de las células endoteliales del epitelio de la mucosa intestinal (Mylonas PG et al. 2000). La presencia de GH fue capaz de inducir la proliferación celular, y la supervivencia de los linfocitos irradiados mediante la activación de la expresión del gen anti-apoptótico *bcl-2* (Lempereur L et al. 2003). Otra evidencia la supuso el hecho de que la propia GH endógena sintetizada por mioblastos C2C12 era capaz de regular procesos proliferativos y de supervivencia celular

(Segard HB et al. 2003). En estas células, la sobre-expresión del receptor de GH (GHR) suponía un aumento en la velocidad de crecimiento respecto a células no transfectadas, en presencia de suero. Además, las células expresando GHR presentaban capacidad proliferativa en ausencia de suero, mientras que las células salvajes morían por apoptosis. Este hecho era independiente de la administración de GH exógena, es más, la utilización de anticuerpos anti-GH y anti-IGF-1 suponía la inhibición de dichos efectos, lo que sugería que los mioblastos C2C12 son capaces de sintetizar GH endógena, la cual actúa de forma autocrina regulando procesos proliferativos y de supervivencia celular. De forma aún más reciente, un trabajo en células T de linfoma, mostró como la sobre-expresión de GH en las células ejercía un efecto anti-apoptótico sobre las mismas (Arnold RE & Weigent DA. 2004). Pero además de estos efectos anti-apoptóticos, la GH también es capaz de actuar sobre otros aspectos implicados en el mantenimiento celular y tisular. Un trabajo realizado en células Pro-B Ba/F3, donde anteriormente se comprobó el efecto anti-apoptótico de la GH, puso también de manifiesto que la hormona ejercía un efecto proliferativo sobre las células produciendo la entrada en el ciclo celular de las mismas (Baixeras E et al. 2001). Ambos efectos de la GH fueron directos y no mediados por IGF-1. Otro efecto positivo que ejerce la GH es el de actuar como factor neuroprotector. Se comprobó como frente a daño cerebral inducido por hipoxia isquémica la GH actúa como un factor de rescate reduciendo la pérdida neuronal (Scheepens A et al. 2001); posteriormente se observó que esta protección era a través de un efecto anti-apoptótico (Shin DH et al. 2004). Por otro lado se ha demostrado un papel importante de la GH en la regeneración del hígado tras haber sufrido daño, como por ejemplo hepatectomía parcial (Pennisi PA. 2004).

En contraposición, la bibliografía refleja un único estudio en el que se encuentra un efecto pro-apoptótico de la GH. Así, en el año 1999 se publicó un trabajo en el que la GH era capaz de inducir un proceso de luteolisis estructural a través de mecanismos apoptóticos (Kiya T et al. 1999).

Alternativamente a todos estos trabajos que muestran a la GH como regulador del proceso apoptótico, en el año 1999 se publicó un trabajo llevado a cabo en células germinales de

testículo bovino donde se observó que la hormona no ejercía ningún efecto sobre la apoptosis de este modelo celular (Santos RL et al. 1999).

La mayor parte de los trabajos anteriormente comentados argumentan hacia la idea de que la hormona de crecimiento ejerce un efecto protector frente a apoptosis. Las evidencias en el sentido contrario son muy pocas, lo cual hace que los resultados obtenidos en este trabajo coincidan en corroborar dicho efecto protector, sumando así evidencias de la relevancia que la GH tiene ya no sólo a nivel cardíaco. Pero ésta no es la primera evidencia del efecto anti-apoptótico de la GH sobre cardiomiocitos. Un trabajo presentado por Gu Y et al. 2001, trató de determinar el efecto de la GH sobre un modelo de apoptosis inducida por estrés oxidativo en cardiomiocitos neonatales de rata. Los resultados mostraron que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) era capaz de inducir la apoptosis de los cardiomiocitos, y que este efecto apoptótico se veía contrarrestado por el pretratamiento con GH. Dicho efecto se debió, al menos en parte, a la activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs). Por tanto, aún siendo éste un modelo de apoptosis claramente diferente al presentado en esta tesis, los resultados obtenidos con el pretratamiento de GH hablan de un efecto preventivo de esta hormona en cardiomiocitos. Las diferencias entre los modelos de apoptosis vienen dadas por el hecho de que el trabajo de Gu Y et al., presenta una apoptosis inducida en cardiomiocitos neonatales de rata por un estímulo citotóxico, mientras que nuestro modelo experimental muestra una apoptosis que es consecuencia de la falta de suero en el medio de cultivo.

Muchos de los efectos ejercidos por la GH son mediados por IGF-1. Esta molécula se sintetiza principalmente en respuesta a la acción de GH en el hígado, que es el principal productor de IGF-1, aunque también puede ser sintetizada por otros tejidos diana específicos. Los efectos del eje GH/IGF-1 a nivel cardíaco han sido muy estudiados. Sin embargo, existen datos que ponen de manifiesto que al menos algunos de los efectos de la GH a nivel cardíaco no están mediados por IGF-1 (Lu C et al. 2001). El trabajo de Lu C et al., muestra que el efecto hipertrófico y metabólico que ejerce la GH sobre cardiomiocitos no produce cambios en los niveles de ARNm de IGF-1, lo que sugiere que estos efectos son independientes de IGF-1. El efecto anti-apoptótico de la GH en cardiomiocitos relatado en este trabajo, se muestra de

acuerdo con esta afirmación en base a una serie de resultados. En primer lugar, se trató de comprobar si la GH estaría ejerciendo su acción a través de la síntesis endógena de IGF-1. Para ello se administró un anticuerpo anti-IGF-1 en el medio de cultivo de células HL-1, conjuntamente con la GH, para bloquear la acción de la posible síntesis cardíaca de IGF-1. Se trata de un método descrito previamente por otros autores (Baixeras E et al. 2001). Si la acción protectora de la GH se viese revertida, esto significaría que el efecto de la hormona vendría mediado por IGF-1. Los resultados obtenidos mostraron que el anticuerpo no reducía el efecto anti-apoptótico de la GH determinado por el ensayo TUNEL. En segundo lugar se estudió un posible cambio en los niveles de ARNm de IGF-1 tras la administración de GH. Para ello se utilizó un modelo de RT-PCR que permitió diferenciar las distintas clases de ARNm de IGF-1 generadas por *splicing* alternativo (Kamai Y et al. 1996). Los resultados mostraron que los niveles de ARNm de IGF-1 no variaron tras la administración de GH, sola o en combinación con AraC. Por último, mediante radioinmunoensayo, se estudió la posible síntesis de IGF-1 por parte de los cardiomiocitos, lo que permitió determinar la concentración proteica de IGF-1 en el medio de cultivo de nuestras células. Dicho análisis mostró que la concentración de IGF-1 (niveles en el límite de detección del ensayo) no se veía modificada por el tratamiento con GH. Estos resultados están indicando que el efecto protector que ejerce la hormona de crecimiento en cardiomiocitos frente a apoptosis inducida por AraC, no está mediado por la acción de IGF-1, siendo por tanto un efecto directo de la hormona sobre estas células.

Los mecanismos clásicos de señalización intracelular de la hormona de crecimiento tras su unión al receptor son bastante conocidos (Kelly PA et al. 2001). Sin embargo, no ocurre lo mismo en lo que se refiere a los mecanismos que mediarían el efecto regulador de la GH sobre la apoptosis. Zhu T et al. (1998), observaron que la administración de GH a células de ovario de hámster chino inducía la fosforilación de JAK2 poniendo en marcha una vía de señalización capaz de estimular a FAK (quinasa de adhesión focal). Los autores sugieren que esta quinasa podría estar desempeñando un papel en la regulación de diversos efectos de la GH, como la prevención de la apoptosis. Resultados más concluyentes se presentaron en otro trabajo sobre el mismo modelo celular. Se observó que la GH promovía la polimerización de las cuatro

isoformas de tubulina, lo cual produce una estabilización de la red de microtúbulos de manera que protege a las células frente a la apoptosis inducida por colchicina (Goh EL et al. 1999). Se ha contrastado que el efecto regulador de la GH en células de la granulosa de ovario bovinas es dependiente del sistema cAMP/PKA. La utilización de bloqueadores de la proteína quinasa A previene de forma parcial o total diversos efectos de la GH, entre ellos la regulación de la apoptosis (Sirotkin AV & Makarevich AV. 1999). Por otro lado, también se ha demostrado que la GH utiliza una vía clásica para actuar frente a la apoptosis, como es la familia de proteínas Bcl-2 (Haeffner A et al. 1999, Mitsunaka H et al. 2001, Kolle S et al. 2002), muy conocida por estar implicada en la regulación de la apoptosis. Se ha demostrado que la GH ejerce un papel anti-apoptótico en monocitos y linfocitos T y B activados disminuyendo la apoptosis mediada por Fas, aumentando la expresión génica de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Haeffner A et al. 1999, Mitsunaka H et al. 2001). Pero también se ha observado como GH protege a través de esta vía sin alterar la expresión de la proteína Bcl-2, disminuyendo la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax (Kolle S et al. 2002). Se comprobó asimismo que GH podía ejercer su efecto protector a través de Akt, una quinasa serina/treonina que juega un papel muy importante en el control de la supervivencia celular (Costoya JA et al. 1999, Segard et al. 2003). La administración de la hormona a células HL-60 y CHO, inducía la activación de Akt mediante fosforilación. Cuando estas células se transfectaban con un dominante negativo de Akt, la acción protectora de la GH se veía revertida. Por otro lado, se ha visto que la GH endógena producida por miocitos C2C12, es suficiente para proteger a estas células de la muerte inducida por serodeprivación, y que el mecanismo implicado incluiría a Akt (Segard HB et al. 2003). En contraste a los hallazgos mostrados anteriormente, el trabajo de Costoya JA et al., no encontró que la GH mediara su efecto anti-apoptótico a través de Bcl-2, ya que los niveles de la proteína permanecían invariables tras la activación del receptor de GH. Esta disparidad de datos muestra que la hormona de crecimiento puede ejercer su efecto a través de varias vías implicadas en la regulación de la supervivencia celular, y que esto posiblemente dependa en gran medida del tipo celular y del estado en que se encuentre la célula. El trabajo anteriormente comentado de Gu Y et al. (2001), pone de manifiesto la activación de quinasas reguladas por señales extracelulares

(ERKs) por parte de GH. La utilización de mutantes dominante negativos e inhibidores específicos ha permitido delinear la vía transductora de la señal de la GH, en la cual se incluirían las moléculas Ras y proteínas quinasa como JAK2, Src y el receptor de EGF, que estarían influyendo en la activación de ERK (Gu Y et al. 2001). Todos los trabajos mencionados anteriormente son muestras de las distintas vías de señalización activadas por la hormona de crecimiento según el modelo celular sobre el que actúa y las circunstancias del mismo.

Un objetivo de nuestro trabajo era estudiar qué mecanismos podrían estar implicados en la regulación del efecto anti-apoptótico de GH en cardiomiocitos. Nos centramos en concreto en el posible papel de la fosfatasa calcineurina. La calcineurina es una fosfatasa calcio/calmodulina dependiente de gran importancia en la regulación de procesos apoptóticos. Además, esta proteína es un importante regulador de procesos implicados en el desarrollo de patologías cardíacas como la hipertrofia (Molkentin JD et al. 1998). Así por ejemplo, una sobrecarga de presión o estimulaciones con endotelina-1, son capaces de inducir hipertrofia mediada por calcineurina (Lim HW et al. 2000, Zhu W et al. 2000). Se ha descrito que este efecto puede ser mediado por la defosforilación del factor de transcripción NF-AT3, lo que permite su translocación al núcleo, y la posterior regulación de la expresión de genes hipertróficos cardíacos (Molkentin JD et al. 1998). La utilización de inhibidores farmacológicos de calcineurina, como ciclosporina A y FK-506 (Molkentin JD et al. 1998, Meguro T et al. 1999, Shimoyama M et al. 1999), así como de inhibidores peptídicos no competitivos, como cain y AKAP (Taigen T et al. 2000), ha permitido comprobar que la activación de esta fosfatasa es necesaria para el desarrollo de hipertrofia. A este nivel existe controversia ya que algunos trabajos han concluido que los inhibidores de la calcineurina no son capaces de bloquear el efecto hipertrófico de ésta (Luo Z et al. 1998, Ding B et al. 1999). Los motivos de la discrepancia existente entre estos trabajos no están claros.

El efecto regulador de la calcineurina sobre la apoptosis se ha observado en varios tipos celulares. Trabajos realizados en neuronas, linfocitos, y líneas celulares de cáncer han demostrado efectos pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la calcineurina (Molkentin JD. 2001). En un trabajo desarrollado sobre cultivo primario de cardiomiocitos, De Windt et al. (2000),

indujeron la hipertrofia de cardiomiocitos mediante expresión de la forma activa de calcineurina. Consecuentemente, se observó que este hecho era capaz de proteger a los cardiomiocitos frente a apoptosis, protección que era mediada por un mecanismo de activación de NF-AT3 y Akt/proteína quinasa B (PKB) (De Windt LJ et al. 2000). Este trabajo representa una clara demostración de un efecto regulador de la calcineurina sobre la apoptosis en cardiomiocitos. Esta evidencia, y el hecho de que la calcineurina participa en la regulación de la hipertrofia cardiomiocitaria, plantean a la proteína como un regulador potencial de las respuestas a estrés y apoptosis de este tipo celular (Molkentin JD. 2001). Mientras que el tratamiento de cardiomiocitos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene un efecto inductor de apoptosis, la estimulación de las células con endotelina-1 ejerce un efecto protector frente a ella, y se ha comprobado que dicho efecto está mediado por la activación de calcineurina (Kakita T et al. 2001). De acuerdo con este trabajo está el estudio de De Windt LJ et al. (2000), en el que ratones transgénicos que expresan la forma activa de calcineurina se ven protegidos frente apoptosis inducida por isquemia-reperfusión. Sin embargo, existe una contradicción con el trabajo de Saito S et al. (2000), que muestra como el tratamiento con isoproterenol promueve apoptosis miocitaria estimulada por la actividad de calcineurina, y la utilización de ciclosporina A y FK-506, bloqueaba la apoptosis inducida por isoproterenol. Este resultado sugiere, en contraposición a lo mostrado antes, que la activación de calcineurina se corresponde con un aumento de la apoptosis en cardiomiocitos. Un dato interesante es que en este mismo trabajo Saito S et al., comprueban como ratones transgénicos que expresan un dominante negativo de calcineurina, presentan una apoptosis aumentada en respuesta a daño causado por isquemia /reperfusión. Este dato sugiere todo lo contrario a sus resultados previos, siendo la activación de la calcineurina un mecanismo protector. En resumen, todos estos datos sugieren que la actuación de la calcineurina tiene que ser interpretada dentro de un contexto celular en el que están interviniendo otras vías moleculares de señalización. Parece por lo tanto que el papel que desempeña la calcineurina sobre la apoptosis de los cardiomiocitos no está del todo claro, y que son necesarios estudios más detallados en este sentido.

Los resultados obtenidos en este trabajo, tanto por citometría de flujo como por tinción vital Hoechst, mostraron que el efecto anti-apoptótico de la GH se veía claramente reducido por la inhibición de la calcineurina mediante la utilización de ciclosporina A y FK-506. Este hecho parece indicar que la fosfatasa calcineurina está implicada en la vía de señalización iniciada por la activación del receptor de GH en cardiomiocitos HL-1.

Por otro lado, el efecto pro-apoptótico de AraC en cardiomiocitos induce la activación de la MAPK p38 mediante fosforilación en tirosina de ésta, pero la presencia de GH en el medio de cultivo reduce este efecto disminuyendo dicha fosforilación. La vía molecular de las MAPK, en particular p38, está implicada en la regulación de la apoptosis, pero no está del todo claro en qué sentido actúa esta proteína. Existen trabajos que demuestran un efecto anti-apoptótico de esta proteína en cardiomiocitos (Zechner D et al. 1998, Wang Y et al. 1998), contrariamente a lo que muestra nuestro trabajo. La sobre-expresión de un activador específico de p38 en cultivo primario de cardiomiocitos protegió a las células de una apoptosis inducida (Zechner D et al. 1998), y por su parte, la administración de un inhibidor específico de p38 bloqueó el efecto protector frente a apoptosis. Por otro lado, se ha determinado que la activación de p38 $\beta$  es capaz de inducir respuesta hipertrófica y promover la supervivencia de los cardiomiocitos, mientras que la activación de p38 $\alpha$  conduce a un aumento de la apoptosis miocitaria (Wang Y et al. 1998). Esta contraposición en los resultados estaría sugiriendo que la vía de p38 está involucrada tanto en la hipertrofia cardíaca como en la apoptosis, y que tendría un papel significativo en la patología de la insuficiencia cardíaca (Wang Y et al. 1998). Además de estos datos, un efecto inductor de la apoptosis en cardiomiocitos también se ha descrito para p38 (Ma XL et al. 1999). En respuesta a isquemia-reperfusión se ha comprobado como existe una marcada activación de p38 que se ve reflejada en una clara incidencia sobre la apoptosis cardiomiocitaria. La administración de un inhibidor de p38 a corazones tras isquemia-reperfusión, bloqueó de forma evidente la activación de p38, lo cual derivó en una menor incidencia de la apoptosis sobre el miocardio (Ma XL et al. 1999). Otra demostración del efecto inductor de la apoptosis por p38 lo presentaron Zhu W et al. (1999). Este trabajo muestra la importancia que la familia de las MAPK tiene sobre la regulación de la apoptosis inducida por

daunomicina, un agente quimioterapéutico. La exposición de ratas a este compuesto inducía apoptosis cardiomiocitaria y activación de p38, y la administración de un inhibidor específico de p38 producía una reducción significativa de los niveles de apoptosis. En concordancia con estos resultados se ha demostrado que la activación de p38 también participa en la apoptosis inducida por doxorubicina sobre cardiomiocitos, siendo ésta abolida por un inhibidor específico de p38 (Kang YJ et al. 2000). Independientemente de la acción de p38 en cardiomiocitos, un dato interesante a la hora de interpretar los resultados obtenidos en este trabajo, es el hecho de que anteriormente se había descrito que p38 participa de la apoptosis inducida por AraC (Stadheim TA et al. 2000). Así, se observó que células promielocíticas de leucemia humana HL-60 tratadas con el citostático AraC, presentaron una apoptosis dependiente de p38. La presencia de un inhibidor de p38 suprimió la apoptosis inducida por AraC (Stadheim TA et al. 2000). En conjunto, estos últimos trabajos sobre la relación entre apoptosis, p38 y AraC, validarían los resultados obtenidos en el modelo de apoptosis inducida por AraC en cardiomiocitos HL-1, donde la activación de p38 forma parte del efecto pro-apoptótico de este citostático. Además, otro dato que estaría apoyando estos resultados es el hecho de que p38 está involucrada en la regulación de la apoptosis mediada por calcineurina (Lotem J et al. 1999). En células de leucemia mieloide, donde la activación de calcineurina es capaz de activar vías de señalización opuestas con efectos tanto inhibidores como inductores de la apoptosis, se ha visto que la apoptosis puede estar mediada por la vía de p38 (Lotem J et al. 1999). La interpretación del efecto protector de GH sobre la apoptosis cardiomiocitaria implica una activación de calcineurina y una inactivación de p38; pero en este sentido la discusión sigue abierta, ya que los estudios reflejados en la bibliografía muestran que las acciones de ambas proteínas se ven sometida a la interacción con otras vías de señalización, que dependerán en gran medida del estatus celular.

En conclusión, nuestros resultados presentan a la hormona de crecimiento como un agente protector frente a apoptosis en dos modelos de cardiomiocitos, cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata y línea celular de ratón HL-1, muestran que este efecto de la GH es directo y no mediado por la acción de IGF-1, y que el mecanismo responsable de la

protección está involucrando a la fosfatasa calcineurina, posiblemente a través de la prevención de la fosforilación de p38. Basándose en estos resultados, se podría hipotetizar que la prevención de la apoptosis cardiomiocitaria a través de la calcineurina podría ser uno de los mecanismos por el cual la GH tiene efecto beneficioso a nivel cardíaco.

Se sabe que la apoptosis cardiomiocitaria es un mecanismo relevante en el sistema cardiovascular, que interviene desde las primeras etapas de desarrollo cardíaco, donde desempeña un papel fundamental en la determinación de la estructura del corazón. Pero son muchas las evidencias que ponen de manifiesto la relevancia que este proceso de muerte celular tiene en la enfermedad cardíaca e insuficiencia cardíaca (Haunstetter A & Izumo S. 1998, Kang PM & Izumo S. 2000). Se ha observado que la apoptosis cardiomiocitaria ocurre en los estadios más tempranos de la disfunción miocárdica. En éstos, participa empeorando el funcionamiento ventricular izquierdo, debido a una reducción en la masa contráctil de cardiomiocitos (Haunstetter A & Izumo S. 1998), y contribuyendo a la pérdida progresiva de cardiomiocitos durante la insuficiencia cardíaca (Kang PM & Izumo S. 2000). Por tanto, el inicio y progresión de diversas patologías cardíacas podría ser una consecuencia de la incidencia de una apoptosis excesiva, lo cual sería el desencadenante final de insuficiencia cardíaca.

Aunque el grado de apoptosis que se da en el corazón que sufre insuficiencia cardíaca es relativamente bajo en términos absolutos, este sigue siendo significativamente mayor que el que se da en un corazón normal (Kang PM & Izumo S. 2000). Principalmente cardiomiopatía dilatada idiopática y cardiomiopatía isquémica, son las formas más comunes de insuficiencia cardíaca en las que se ha descrito apoptosis, pero existen otras entre las que se encuentran infarto agudo de miocardio, aterosclerosis, miocarditis, rechazo de trasplante cardíaco, etc. (Kang PM & Izumo S. 2000). Por tanto, la posibilidad de conseguir la inhibición de la apoptosis de los cardiomiocitos supondría un potencial avance en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

En décadas pasadas, la insuficiencia cardíaca era considerada como un desorden hemodinámico, lo que hacía que las estrategias terapéuticas se dirigiesen hacia el control o corrección de parámetros hemodinámicos. Posteriormente, se comprobó que anomalías

hemodinámicas no permitían explicar la progresión de la insuficiencia cardíaca, lo que llevó a pensar en la existencia de otros mecanismos que podrían estar actuando. En los últimos años, la visión de la enfermedad ha evolucionado y la atención se ha fijado en el estudio de los cambios hormonales que tienen lugar durante la progresión de la misma. Por tanto, actualmente estamos ante una visión de la insuficiencia cardíaca como una patología neurohormonal (Ghio S et al. 2003).

Dado el cambio conceptual que ha sufrido la interpretación de la enfermedad cardíaca, los esfuerzos terapéuticos desarrollados también han sufrido un nuevo enfoque. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas sustancias que pudieran actuar frenando la progresión de la insuficiencia cardíaca. Como se cita anteriormente, la pérdida celular, en particular la apoptosis cardiomiocitaria, es uno de los factores iniciadores y determinantes de dicha progresión. Por tanto, debido a su incidencia sobre el proceso de muerte celular, diversas sustancias como los factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, han cobrado protagonismo en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Esta afirmación vendría justificada por el hecho de que algunas de estas sustancias son capaces de actuar como factores de supervivencia previniendo la aparición de apoptosis (Pulkki KJ. 1997, Kiess W & Gallaher B. 1998).

Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, que ponen de manifiesto la capacidad de la hormona de crecimiento para regular procesos de muerte en cardiomiocitos, podrían suponer una primera etapa dentro del desarrollo del conocimiento necesario para la consecución de alternativas terapéuticas basadas en la utilización de la GH que permitan la prevención y progresión de patologías como la insuficiencia cardíaca.



## **CONCLUSIONES HORMONA DE CRECIMIENTO**



1. Los cardiomiocitos HL-1 presentan receptores de GH funcionales capaces de activar moléculas situadas en la vía clásica de señalización de la hormona de crecimiento.
2. La hormona de crecimiento presenta un efecto protector frente a la muerte celular por apoptosis en cardiomiocitos. Este efecto es independiente de IGF-1.
3. El efecto protector de GH sobre cardiomiocitos está mediado por la acción de la fosfatasa calcineurina.
4. La acción pro-apoptótica del citostático AraC está mediada por la activación de p38 MAPK. La presencia de GH es capaz de inhibir de forma parcial dicha activación.

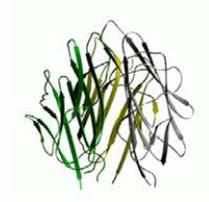


## **INTRODUCCIÓN ADIPONECTINA**



## 1. Historia

La adiponectina es una hormona polipeptídica que fue identificada originalmente entre los años 1995 y 1996 por cuatro grupos independientes (Scherer PE et al. 1995, Maeda K et al. 1996, Nakano Y et al. 1996, Hu E et al. 1996) utilizando diferente metodología (Figura 1). Maeda K et al. (1996), determinaron la



**Figura 1. Configuración espacial de adiponectina.**

expresión del ARNm de adiponectina (apM1) en tejido adiposo humano, mientras que Nakano Y et al. (1996), la identificaron mediante purificación a partir de plasma humano, llamándola GBP28 (gelatin-binding protein-28). Por otro lado los grupos de Scherer PE et al. (1995) y Hu E et al. (1996), identificaron la hormona trabajando en adipocitos de ratón. Ambos grupos realizaron clonaje diferencial del ADNc de ratón antes y después de la diferenciación de los adipocitos, llamándole Acrp30 (adipocyte complement-related protein 30-kDa) y AdipoQ respectivamente.

## 2. Estructura proteica

Adiponectina, también llamada GBP-28, apM1, AdipoQ y Acrp30, es una proteína que contiene 247 aminoácidos con una masa molecular esperada de 28 kDa. Consiste en una secuencia señal amino-terminal de 27 aminoácidos, sin homología significativa a otras proteínas, y 22 repeticiones de las secuencias Gly-X-Pro o Gly-X-X. Presenta también un dominio globular carboxi-terminal con homología a numerosas proteínas como los dominios globulares de los colágenos tipo VIII y X, las subunidades del factor del complemento C1q, precerebelin, y la proteína que se encuentra en el suero de animales hibernantes (Scherer PE et al. 1995).

La proteína posee una secuencia señal en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal, seguida de un corta región hipervariable sin homología entre especies, un dominio similar a colágeno, y un dominio globular similar a C1q en el extremo COOH-terminal (Hu E et al. 1996, Shapiro L & Scherer P. 1998, Takahashi M et al. 2000, Kishore U & Reid KB. 2000, Diez JJ & Iglesias P. 2003) (Figura 2). Esta hormona circula abundantemente en plasma humano, siendo su concentración

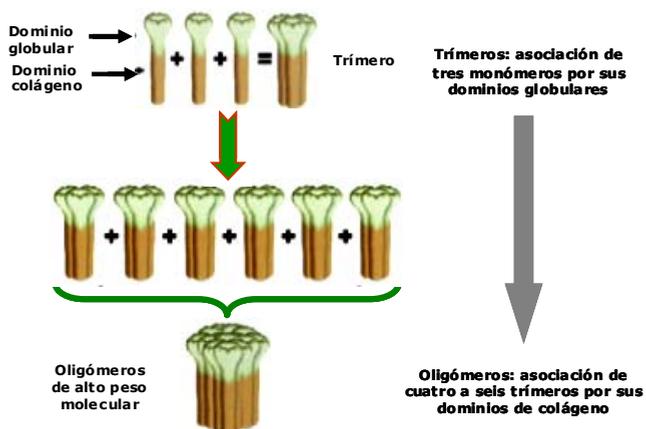
de 5 a 30  $\mu\text{g/ml}$ , lo que se correspondería con un 0.01% del total de proteínas plasmáticas (Arita Y et al. 1999).



**Figura 2. Estructura proteica de adiponectina. Posee una secuencia señal en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal, seguida de un corta región hipervariable, un dominio similar a colágeno, y un dominio globular en el extremo COOH-terminal.**

Tras su síntesis, la adiponectina de mamíferos sufre hidroxilación y glicosilación como modificaciones post-traduccionales dando lugar a ocho isoformas diferentes. Estas modificaciones post-traducción serán necesarias para que la proteína presente su actividad biológica (Chandran M et al. 2003).

La disposición normal que presenta la adiponectina es la de trímeros (Shapiro L & Scherer P. 1998). Estos trímeros se forman a partir de la asociación de tres monómeros por sus dominios globulares. La forma monomérica de la adiponectina no se ha localizado en plasma y parece que sólo está presente dentro de los adipocitos. A partir de la asociación de trímeros, es como se forman las estructuras de alto orden molecular u oligómeros o multímeros. Estos oligómeros se forman a través de las interacciones existentes entre las triples hélices de colágeno, y se construyen mediante la asociación de cuatro a seis trímeros a través de sus dominios de colágeno (Shapiro L & Scherer P. 1998). Estas estructuras oligoméricas se pueden encontrar circulando en plasma (Figura 3). Cuando el monómero de adiponectina no presenta el



**Figura 3. Conformación estructural de la adiponectina. Tres monómeros de adiponectina se asocian dando lugar a trímeros, los cuales a su vez se asocian dando lugar a oligómeros. Oligómeros de adiponectina circula en plasma a concentraciones de 5 a 30  $\mu\text{g/ml}$ .**

dominio de colágeno, el dominio globular también es capaz de ensamblarse formando trímeros (forma globular), pero éstos no son capaces de configurar estructuras de orden superior (Berg AH et al. 2002). Por tanto, parece clara la importancia que tienen las interacciones entre ambos dominios, globular y de colágeno, en asegurar la estabilidad y actividad de las estructuras multiméricas. Así por ejemplo, el trabajo de Scherer P et al. (1995), mostró que la adiponectina expresada por adipocitos 3T3-L1 forma trímeros, hexámeros y multímeros largos. Por su lado los trabajos de Tsao TS et al. (2002), y Arita Y et al. (1999), encontraron la existencia de tres especies de adiponectina distintas en suero, y el trabajo de Waki H et al. (2003), a partir de adiponectina humana y de ratón que circula en plasma y de adiponectina expresada en adipocitos o *E. coli*, observó la presencia de un amplio rango de estructuras multiméricas que van desde los trímeros hasta estructura de alto peso molecular. Este mismo trabajo determinó la presencia de un residuo de cisteína en la región amino terminal, responsable de la formación de estructuras multiméricas superiores a trímeros. Actualmente, en la bibliografía se clasifica a los distintos complejos oligoméricos de adiponectina presentes en la circulación como complejos de bajo peso molecular, de mediano peso molecular y de alto peso molecular (Tsao TS et al. 2003, Wang Y et al. 2005).

### **3. Localización cromosómica**

El análisis de la localización cromosómica del gen de adiponectina, así como el estudio del patrón de expresión, fue desarrollado en ratón por Das K et al., en el año 2001. Este grupo demostró que la secuencia del gen de adiponectina consta de tres exones separados entre sí por dos intrones, siendo la longitud del gen de 20 kb. El primer exón consta de 30 bases y se encuentra 8.5 kb *upstream* del exón II, que consta de 229 bases. El exón II contiene una metionina de inicio y codifica alrededor de la mitad del dominio de colágeno de adiponectina. El intrón II contiene 1626 bases y está seguido por el exón III que codifica la otra mitad del dominio de colágeno, el dominio globular completo y la región 3'-no traducida del ADNc. Estudios llevados a cabo en humanos, muestran que la estructura de intrones y exones del gen, se encuentra muy conservada entre ambas especies, ratón y humano. En humanos, el gen de adiponectina se extiende a lo largo de 16 kb, y se compone de tres exones y dos intrones. La

localización del gen de adiponectina en ratón, está en una posición situada a un 26% de distancia de la heterocromatina-eucromatina que limita con el telómero del cromosoma 16, siendo un área que se corresponde con la banda B3-B4. En humanos, el gen de adiponectina se localiza en el cromosoma 3q27. Estudios realizados confirman que el gen homólogo de Acrp30 en humanos se localiza en el cromosoma 3q27 sinténico al locus de ratón 16B3-B4. Sin embargo, un trabajo publicado por Schäffler A et al., en el año 1999, mostraba como el locus de adiponectina en humanos mapeaba en el cromosoma 1 dentro del intervalo comprendido entre 1q21.3-q23, que se corresponde con un locus de susceptibilidad a la Hiperleptinemia Combinada Familiar (HCF). En contraposición a los resultados de Schäffler A et al., y de acuerdo con el grupo de Das K et al., dos trabajos publicados en los años 1999 y 2000, realizados en humanos, sitúan la localización del gen de adiponectina en el cromosoma 3q27 (Saito K et al. 1999, Takahashi M et al. 2000).

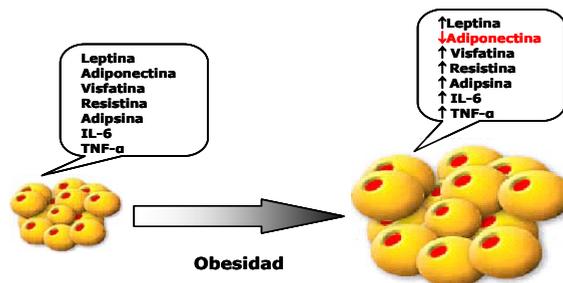
A nivel de ARNm esta proteína presenta en ratón dos tipos de transcriptos, uno mayoritario de 1.2 kb, y otro de 4.5 kb (Das K et al. 2001). Sin embargo, en humanos se expresa de forma exclusiva el transcripto de 4.5 kb (Hu E et al. 1996). La expresión del ARNm de adiponectina se concentra mayoritariamente en el tejido adiposo, dentro de los adipocitos, tanto en ratón como en rata. En ratón se ha visto que el ARNm de AdipoQ es entre 50-100 veces más abundante que en otros tejidos. En rata la distribución del mensajero también está muy restringida al tejido adiposo, pero en esta especie aparecen tres ARNm distintos, de 2.5, 1.8, y 1.2 kb, siendo los tres específicos de este tejido (Hu E et al. 1996).

#### **4. Características generales del tejido adiposo**

Tradicionalmente, se ha visto al tejido adiposo como un reservorio pasivo para el almacenamiento de energía. Desde el año 1987, este punto de vista comenzó a cambiar al identificarse como un importante sitio para el metabolismo de esteroides sexuales (Siiteri PK. 1987), y producción de adiposina. La identificación posterior y caracterización en el año 1994 de leptina, estableció al tejido adiposo como un firme órgano endocrino (Zhang Y et al. 1994). El tejido adiposo secreta un número de péptidos bioactivos y proteínas llamada “adipocitoquinas”, que actúan tanto de forma local (autocrina/paracrina), como de forma sistémica (endocrina).

Todos estos factores derivados del tejido adiposo están jugando un papel importante en la regulación de la homeostasis corporal, mediante la regulación de numerosos procesos biológicos y fisiológicos. Entre estos procesos cabe destacar la regulación de la ingesta de comida, balance energético, función reproductora, función inmune, acción de la insulina, metabolismo de glucosa y lípidos, angiogénesis y remodelado vascular, y regulación de la coagulación y presión sanguínea (Guerre-Millo M. 2004). Además, el tejido adiposo tiene la capacidad de integrar señales procedentes de otros órganos y responder regulando la secreción de múltiples proteínas. Esta respuesta, como participante de la homeostasis energética corporal, puede afectar de forma negativa o positiva a otros sistemas, dependiendo del estado funcional del tejido.

La importancia de la función endocrina que desempeña el tejido adiposo, se ha puesto de manifiesto por las consecuencias metabólicas adversas tanto del exceso como de la deficiencia del tejido adiposo. El exceso de tejido adiposo u obesidad, en particular obesidad visceral, se asocia con resistencia a insulina, hiperglucemia, dislipemia, hipertensión, y con estados pro-trombóticos y pro-inflamatorios. Todas estas características estarían englobadas dentro del termino actualmente designado como Síndrome Metabólico o Síndrome X (Sowers JR. 2003). Por su parte, la deficiencia de tejido adiposo o lipodistrofia, se asocia también con rasgos del síndrome metabólico tanto en humanos como roedores (Kershaw EE & Flier JS. 2004). La cantidad de triglicéridos almacenados dentro de cada célula adiposa es un importante determinante del tamaño del tejido adiposo (WAT). Se sabe que todas las adipocitoquinas son derreguladas en respuesta a alteraciones de la masa del tejido (Figura 4), pero la vía molecular



**Figura 4.** El tejido adiposo secreta una serie de moléculas denominada adipocitoquinas. La secreción de éstas se ve alterada en obesidad.

que explicaría la unión entre el tamaño de los depósitos adiposos y el ratio de producción de una adipocitoquina específica, sigue, en la mayoría de los casos, sin estar definida. Por tanto, actualmente el tejido adiposo está reconocido como un órgano implicado en la patogénesis de los distintos desordenes metabólicos derivados del exceso y deficiencia del mismo.

Los adipocitos son un tipo celular de gran relevancia. Son células capaces de almacenar el exceso de energía en forma de lípidos, y además son capaces de cambiar drásticamente su tamaño de acuerdo con las necesidades metabólicas. Esto supone una gran capacidad de crecimiento para este tejido, haciendo de él quizás el único tejido corporal con capacidad de aumentar de tamaño de forma drástica sin un cambio del fenotipo celular (Rajala MW & Scherer PE. 2003).

El tiempo de desarrollo en el cual los adipocitos están totalmente diferenciados varía entre especies. En ratón existe muy poco o casi no existe acumulación de lípidos en el nacimiento. Es tras este momento, en las siguientes 24 horas, cuando la morfología característica del adipocito se desarrolla (Wang ND et al. 1995). Por otro lado, en rata los adipocitos aparecen en estadios tempranos del desarrollo, existiendo ya acumulación de triacilglicerol antes del parto (Teruel T et al. 1995). La expresión de adiponectina en ratón puede ser detectada en estadios tardíos de la embriogénesis, en el día 17 de gestación (Das K et al. 2001). No existen datos bibliográficos a este respecto en rata y humanos.

## **5. Síntesis de adiponectina**

Hasta muy recientemente, se creía que adiponectina se expresaba única y exclusivamente en adipocitos, siendo su expresión inducida unas 100 veces durante la diferenciación de éstos (Scherer PE et al. 1995). En el período de diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos (adipogénesis), la expresión de la hormona se ve inducida de forma muy fuerte entre los días 2 y 4, coincidiendo con la expresión temporal de otras proteínas características de adipocitos como GLUT4 (Charron MJ et al. 1989) y Rab3D (Baldini G et al. 1992). Estudios de desarrollo embrionario en ratón, mostraron que la expresión de adiponectina puede ser detectada en estadios tardíos de la embriogénesis, en el día 17 de gestación (Das K et al. 2001).

Recientemente, son varios los autores que han demostrado la síntesis de adiponectina en tejidos diferentes al adiposo. Así, en el año 2001, Yoda-Murakami M et al., demostraron que la expresión de adiponectina se veía elevada de forma muy marcada en hígado de ratones, tras la administración de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). Este trabajo demuestra de forma clara la síntesis de la hormona por células hepáticas, y supone la primera demostración de que esta adipocitoquina se expresa en células no adipocíticas. Posteriormente, el trabajo presentado por Staiger H et al. (2003), muestra como la expresión de adiponectina es inducida en miotubos humanos mediante la incubación con un sobrenadante enriquecido con adiponectina, procedente del cultivo de células HEK293. La expresión del gen de adiponectina se veía regulada positivamente, lo que sugería un posible efecto autocrino de la hormona. Más recientemente, Berner HS et al. (2004), demostraron como osteoblastos primarios humanos *in vitro*, son capaces de expresar adiponectina y como la hormona está regulada en células óseas. Por su parte, Delaigle AM et al. (2004), demostraron la inducción, por parte de citoquinas inflamatorias, de la expresión de adiponectina en músculo esquelético de ratones. Comprobaron como la administración de varias citoquinas inflamatorias era capaz de inducir adiponectina en miotubos murinos y humanos cultivados (Tabla 1).

---

**Demostrada la síntesis de adiponectina en:**

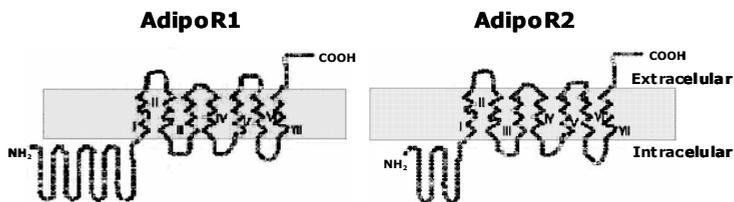
- > **Adipocitos**
  - > **Células de músculo esquelético (miotubos)**
  - > **Hepatocitos**
  - > **Osteoblastos**
- 

**Tabla 1. La expresión de adiponectina solamente se ha determinado en cuatro tejidos.**

## 6. Receptores de adiponectina

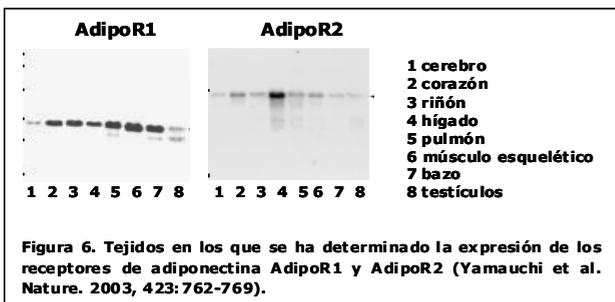
Los receptores de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, se clonaron en el año 2003 (Yamauchi T et al. 2003a). Ambos receptores contienen 7 dominios transmembrana pero estructuralmente y funcionalmente son muy distintos de los receptores acoplados a proteínas G (Figura 5). El receptor AdipoR1 se expresa abundantemente en músculo, mientras que AdipoR2 se expresa de forma mayoritaria en el hígado. La homología del receptor 1 entre humanos y ratón es de un 96.8%, mientras que para el receptor 2 es de un 95.2%. La afinidad de ambos receptores por la hormona varía en función de si ésta se presenta en forma globular o en forma

larga. AdipoR1 en humanos y ratón se localiza en el cromosoma 1p36.13-q41 y1 E4, mientras que AdipoR2 en 12p13.31 y 6 F1 respectivamente.



**Figura 5. Estructura de los receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2. Ambos receptores presentan 7 dominios transmembrana, pero son estructural y funcionalmente distintos a los receptores acoplados a proteínas G.**

AdipoR1 se expresa de forma ubicua, pero principalmente en músculo esquelético. En el caso de AdipoR2, aunque se expresa también en muchos tejidos, la mayor expresión aparece en el hígado (Figura 6). La estructura proteica de los receptores fue determinada en ratón. AdipoR1 consta de 375 aminoácidos con un peso molecular de 42.4 kDa y AdipoR2 consta de 311 aminoácidos y un peso de 35.4 kDa. El trabajo desarrollado por Yamauchi T et al. (2003a), sugiere que estos receptores podrían estar formando homo y heteromultímeros. Además se trata de proteínas integrales de membrana, donde el extremo N-terminal se haya en el interior y el extremo C-terminal en el exterior de la célula. Esta disposición sería opuesta a la topología de la familia de los receptores acoplados a proteínas G.



En este mismo estudio, y trabajando con miocitos C2C12, los autores demostraron que existen dos sitios de unión para la adiponectina globular, sitios de unión de elevada afinidad y de afinidad intermedia. Por el contrario, para la forma larga de adiponectina existen sitios de unión de afinidad intermedia y de baja afinidad. Mediante la supresión de la expresión de los receptores, los autores observaron que AdipoR1 tiene elevada afinidad por la adiponectina globular y baja afinidad por la forma larga, y que AdipoR2 es un receptor de afinidad intermedia para ambas formas. Por tanto, los efectos biológicos de la adiponectina no solo van a

dependen de las concentraciones circulantes y de las isoformas en que se presenta, sino que también van a depender de la expresión específica de tejido de los subtipos del receptor.

### **6.1. Regulación de los receptores de adiponectina**

Los primeros trabajos desarrollados estudiaron la posible regulación de los receptores bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Así, se comprobó que los niveles de AdipoR1 y AdipoR2 aumentan en músculo esquelético e hígado tras ayuno, y que éstos recuperan los niveles normales tras nueva alimentación. Asimismo, se comprobó que la insulina puede actuar regulando negativamente los niveles de ARNm de ambos receptores (Tsuchida A et al. 2004). Estos mismos autores comprobaron que la expresión de los receptores disminuye significativamente en tejido adiposo y músculo de ratones ob/ob insulina resistentes, los cuales presentan hiperglucemia e hiperinsulinemia. A este hecho se suma la disminución en el número de sitios de unión de adiponectina a sus receptores, lo cual supondría un estado de resistencia a adiponectina (Tsuchida A et al. 2004).

Por otro lado, se sabe que los niveles de adiponectina están reducidos en obesidad. Esto mismo ocurre a nivel de la expresión de ambos receptores, los cuales están disminuidos. La suma de la disminución de los niveles de adiponectina junto con la de los receptores interviene de forma directa en el desarrollo de resistencia a insulina (Kadowaki T & Yamauchi T. 2005).

El estudio de la expresión en músculo esquelético de los receptores de adiponectina en una población de mexicanos americanos no diabéticos, puso de manifiesto la existencia de una correlación positiva entre la expresión génica de los receptores y la sensibilidad a insulina. Se comprobó que aquellos pacientes que tenían un historial familiar de diabetes tipo 2, presentaban menores concentraciones plasmáticas de adiponectina y una menor expresión de los receptores respecto a pacientes sin dicho historial (Civitarese AE et al. 2004). De forma similar se ha comprobado que el músculo esquelético de pacientes con diabetes tipo 2 presenta una menor expresión de los receptores (Debard C et al. 2004). Un estudio similar realizado en pacientes con diabetes tipo 2 tratados con rosiglitazona, demostró que el tratamiento además de incrementar las concentraciones de adiponectina, tuvo como efecto aumentar la expresión de AdipoR1 en el tejido adiposo y disminuirla en el músculo esquelético. Dicho tratamiento no

afectó a la expresión de AdipoR2. Este resultado sugiere la implicación de AdipoR1 como mediador del efecto de adiponectina sobre la sensibilización a insulina, de forma tejido específica (Tan GD et al. 2005).

## 7. Mecanismo de acción de adiponectina

Hasta hace poco, las vías de señalización por las que esta hormona ejerce sus efectos metabólicos eran del todo desconocidas. Los primeros trabajos publicados al respecto identificaron como proteína fundamental a la quinasa dependiente de AMP (AMPK) (Yamauchi T et al. 2002, Tomas E et al. 2002).

### 7.1. Quinasa dependiente de AMP (AMPK)

AMPK es considerada como un regulador del estado energético de la célula. La activación de esta quinasa viene dada por cambios en los niveles de la relación entre AMP y ATP. Todas las células tienden a mantener un equilibrio entre los niveles de AMP y ATP, es decir, un equilibrio entre gasto y síntesis de energía. Cuando el balance energético de una célula disminuye, esto se ve reflejado en un aumento en la relación AMP/ATP. Esta alteración deriva en la activación de AMPK. Una vez activada, AMPK fosforila a una serie de proteínas celulares encargadas de aumentar la síntesis de ATP y de disminuir la utilización del mismo (Zinder WW & Hardie DG. 1999). Aunque AMPK se activa de forma alostérica por AMP, su activación también ocurre por fosforilación en un residuo de treonina Thr-172 dentro de la subunidad catalítica  $\alpha$ , por alguna quinasa situada por encima en la vía de señalización (AMPKK) (Figura 7).

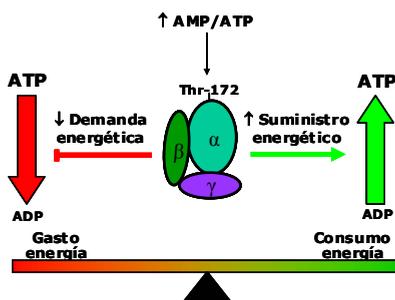
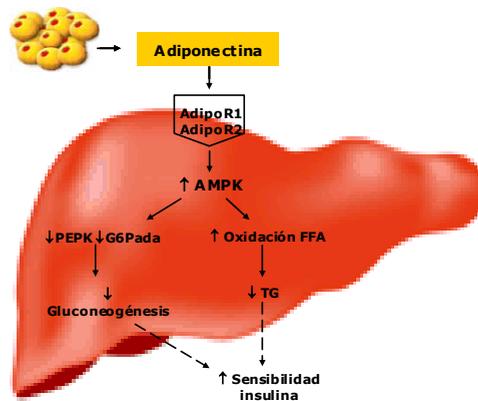


Figura 7. AMPK actúa como un regulador de los niveles celulares de energía. Se activa en respuesta al aumento de la relación AMP/ATP, para incrementar así los depósitos de ATP.

Las principales acciones conocidas de AMPK, y por las cuales se pensó que adiponectina podía estar actuando a través de esta proteína, eran las que ejercía sobre el transporte de glucosa y la oxidación de ácidos grasos. Así, la activación de AMPK induce cambios metabólicos que resultarían beneficiosos en pacientes con diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (Winder WW & Hardie DG. 1999). Estos cambios incluirían un aumento de la captación y metabolismo de la glucosa por parte del músculo, una disminución en la producción hepática de glucosa, una disminución en la síntesis de ácidos grasos y un aumento en la oxidación de los mismos (Hardie DG. 2003). A nivel hepático y de músculo esquelético, existe una molécula considerada clásicamente diana de AMPK, ésta es la acetil CoA carboxilasa

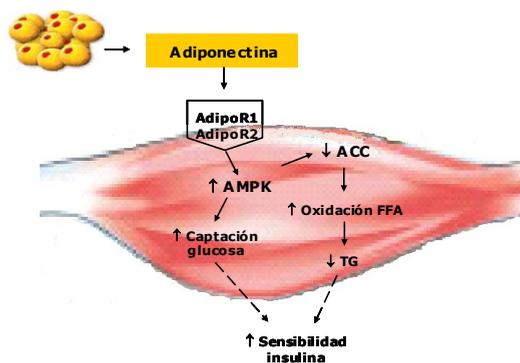


**Figura 8. Acción de adiponectina en el hígado a través de la activación de AMPK. El resultado final es una mayor sensibilidad a insulina.**

(ACC), implicada en la síntesis de ácidos grasos. La activación de AMPK deriva en la fosforilación de ACC, de forma que ésta se inactiva. Además, AMPK activa a la enzima malonil CoA decarboxilasa, de forma que se produce una disminución en la concentración intracelular de malonil-CoA. Esta molécula es un inhibidor alostérico de la enzima carnitina palmitoiltransferasa I, encargada de la transferencia de los ácidos grasos a la mitocondria donde se produce la  $\beta$ -oxidación (Rutter GA et al. 2003). Una mayor oxidación de ácidos grasos se acompaña de un aumento en la síntesis de cuerpos cetónicos. A nivel hepático una de las principales consecuencias de la activación de AMPK es la inhibición de la liberación de insulina (Winder WW & Hardie DG. 1999). La utilización de AICAR, un activador específico de

AMPK ha permitido determinar que AMPK está implicada en la estimulación de la captación de glucosa tanto en hígado como en músculo. Este efecto se debe, al menos en gran medida, al reclutamiento en la membrana plasmática del transportador de glucosa GLUT 4 (Winder WW & Hardie DG. 1999, Rutter GA. 2003).

En el año 2002 aparecen los primeros trabajos que demuestran que la adiponectina ejerce sus efectos a través de AMPK. El trabajo de Yamuchi T et al., muestra como adiponectina, tanto forma larga como globular, son capaces de activar AMPK en el músculo esquelético. Sin embargo, solo la forma larga de adiponectina tiene el mismo efecto en el hígado. La fosforilación de AMPK en miocitos de músculo esquelético deriva en la fosforilación de acetil coenzima A carboxilasa (ACC), oxidación de ácidos grasos y captación de glucosa. En hígado, dicha activación va acompañada de fosforilación de ACC y reducción de la expresión de moléculas involucradas en la gluconeogénesis, lo que supone una disminución de los niveles de glucosa *in vivo* (Figuras 8 y 9). La expresión tanto en miocitos como en



**Figura 9. Acción de adiponectina en músculo esquelético a través de la activación de AMPK. El resultado final es una mayor sensibilidad a insulina.**

hepatocitos de un dominante negativo para la subunidad  $\alpha$  de AMPK suprime por completo, o de forma muy significativa, los efectos inducidos por adiponectina. Por otro lado Tomas E et al. (2002), demostraron que la forma globular de adiponectina estimulaba la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético activando AMPK e inhibiendo ACC. También observaron como la administración de adiponectina inducía un aumento en el transporte de glucosa mediado por AMPK. Asimismo, recientemente se ha demostrado que adiponectina estimula la captación de

glucosa en adipocitos por un mecanismo dependiente de AMPK. La activación que la adiponectina realiza sobre la actividad de AMPK, se vio disminuida de forma significativa al estimular las células con un inhibidor específico de AMPK (araA). Este tratamiento bloqueó por completo la captación de glucosa inducida por adiponectina (Wu X et al. 2003).

Existen algunos otros efectos producidos por adiponectina que están mediados por la actividad de AMPK. Por ejemplo, la síntesis de óxido nítrico inducida por adiponectina en células del endotelio vascular, es inhibida de forma parcial al expresar en éstas un dominante negativo de AMPK (Chen H et al. 2003). La angiogénesis inducida por adiponectina, tanto en células endoteliales (Ouchi N et al. 2004), como tras isquemia en tejido (Shibata R et al. 2004b), se debe a una estimulación de AMPK. Por último, el trabajo más reciente publicado, indica que adiponectina inhibe las señales hipertróficas en el miocardio mediante la activación de la vía de AMPK (Shibata R et al. 2004a).

## **8. Sistema cardiovascular y adipocitoquinas**

Las bases moleculares que relacionan al tejido adiposo (en particular el tejido adiposo visceral) con enfermedad cardiovascular y desórdenes metabólicos no están totalmente esclarecidas. El estudio de la biología de este tejido, y más concretamente de los adipocitos, ha puesto de manifiesto como se cita anteriormente, la evidencia de que los adipocitos son capaces de producir y secretar una serie de sustancias bioactivas denominadas adipocitoquinas. Este hallazgo supone la demostración de que el tejido adiposo es un órgano endocrino cuya acción puede estar afectando al funcionamiento de otros órganos a través de la secreción de una amplia variedad de adipocitoquinas (Matsuzawa Y. 2005). En el conocimiento de la acción de estas moléculas estaría la clave para entender la relación que existe entre el tejido adiposo y enfermedad cardiovascular.

Existen dos tipos de adipocitoquinas. En el primer grupo estarían aquellas secretadas exclusivamente por el tejido adiposo, es decir, específicas de éste. El segundo grupo correspondería a las adipocitoquinas que son secretadas de forma abundante por el tejido adiposo, pero que no son específicas de éste (Matsuzawa Y. 2005). Un ejemplo de la primera clase de adipocitoquinas sería leptina, y otro de la segunda clase sería PAI-1.

La importancia del tejido adiposo como órgano endocrino viene dada, además de por la cantidad de citoquinas que secreta, por la capacidad que tiene de cambiar drásticamente de tamaño (Rajala MW & Scherer PE. 2003). Esto se va a ver reflejado en cambios fenotípicos a nivel celular, de forma que se producirá una alteración en el patrón de secreción de las adipocitoquinas. Esta derregulación de la producción y secreción de las adipocitoquinas se sabe que está involucrada en el desarrollo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares (Matsuzawa Y. 2005).

Entre estas adipocitoquinas secretadas se incluye adiponectina, resistina, leptina, inhibidor de activador del plasminógeno-1 (PAI-1), factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , e interleuquina-6 (IL-6). En estados de obesidad, estos productos son liberados en cantidades anormales. Cada uno de estas sustancias está directamente implicada como causante de uno u otros factores de riesgo (Grundy SM. 2004). Así por ejemplo, la expresión de citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-6 está aumentada en obesidad, lo cual podría actuar como supresor de la lipólisis y por tanto derivar en resistencia a insulina. En el caso de PAI-1, un aumento de su síntesis, derivada de obesidad, junto con un aumento del fibrinógeno, contribuiría a un estado protrombótico (Grundy SM. 2004).

### 8.1. Obesidad, diabetes y síndrome metabólico

El síndrome metabólico comprende un grupo de alteraciones metabólicas y factores de



**Figura 10. Principales factores de riesgo cardiovascular comprendidos dentro del síndrome metabólico.**

riesgo de enfermedad cardiovascular (CVD), como obesidad abdominal, dislipemia (disminución en la concentración de lipoproteínas de elevada densidad HDL-colesterol o nivel de triglicéridos elevados), hipertensión, intolerancia a la glucosa, y estados pro-inflamatorios y pro-trombóticos (Robinson LE & Graham TE. 2004). Todos estos factores tienden a coincidir simultáneamente en el individuo afecto. El concepto de síndrome metabólico data de hace 50 años,

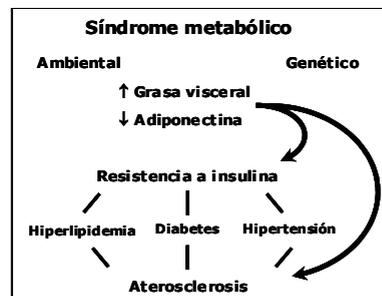
desde entonces, la atención se ha centrado en la agrupación dentro de este término de obesidad, dislipemia, hipertensión y resistencia a insulina (Figura 10).

Aunque no están incluidos en los criterios normales de diagnóstico, algunas otras anomalías metabólicas, las cuales tienen particular relevancia en la enfermedad cardiovascular, han sido asociadas con el síndrome metabólico. Es el caso de una hipertriglicerolemia postprandial, pequeñas partículas densas de colesterol LDL, hiperapolipoproteína B, y actividad fibrinolítica empeorada (Haffner SM. 1996). Más recientemente, alteraciones en mediadores de la inflamación, como la proteína C reactiva y varias citoquinas, se han asociado con síndrome metabólico y riesgo cardiovascular (Yudkin JS et al. 1999, Das UN. 2002).

La obesidad tiene como principal consecuencia física la enfermedad aterosclerótica. Una parte muy importante de dicha enfermedad es mediada por la diabetes tipo 2 (Grundi SM. 2004). Pero este hecho no indica necesariamente que la presencia de obesidad vaya a derivar en alteraciones metabólicas o cardiovasculares. La relación existente entre anomalías metabólicas y cardiovasculares, y el grado de obesidad es variable. Tanto los factores genéticos como los ambientales tienen una gran incidencia sobre las consecuencias metabólicas y cardiovasculares de la obesidad (Figura 11). Por

tanto, estamos ante una compleja asociación entre obesidad central y enfermedad cardiovascular. Se ha demostrado que esta relación es indirecta y dependiente de un aumento en la prevalencia de diabetes, hipertensión y dislipemia. Por otro lado, otros trabajos hablan de que la obesidad es un factor

de riesgo independiente. Una de los objetivos principales de la investigación a este nivel, es el de identificar rasgos de obesidad capaces de reflejar un incremento en el riesgo de desarrollar síndrome metabólico.



**Figura 11. Consecuencias derivadas de las alteraciones asociadas al síndrome metabólico.**

Principalmente la obesidad se define en función del Índice de Masa Corporal (BMI body mass index), ya que esta medida correlaciona fuertemente con la grasa corporal total. Conjuntamente, uno de los criterios utilizados para la estimación de enfermedad cardiovascular y obesidad, es la medida de la circunferencia de la cintura, que definiría el componente de la masa corporal que contribuye a síndrome metabólico (Reilly MP & Rader DJ. 2003). La grasa abdominal se localiza principalmente en dos compartimentos: subcutánea y visceral. La circunferencia de la cintura supone un reflejo del tejido adiposo subcutáneo abdominal y del tejido adiposo visceral abdominal. En este aspecto, ambos tipos de grasa parecen estar implicados en la determinación de factores de riesgo metabólicos, es decir, son determinantes de las complicaciones metabólicas y cardíacas derivadas de obesidad. El exceso de grasa abdominal, tanto visceral como subcutánea, está asociado con factores de riesgo metabólico (Grundi SM. 2004). Algunos autores apuntan que el exceso de grasa visceral está más relacionado con los factores de riesgo metabólico que otros compartimentos (Reilly MP & Rader DJ. 2003, Grundi SM. 2004). Esta afirmación viene avalada por el hecho de que la grasa visceral se caracteriza por una mayor lipólisis (Matsuzawa Y et al. 1999) y un aumento de ácidos grasos libres en el plasma. El aumento de la entrada de estas grasas en el hígado se cree que retarda la eliminación de insulina y que aumenta la síntesis lipídica, lo que resultaría en una hiperinsulinemia e hiperlipidemia periféricas. Sin embargo, en este punto existe controversia, ya que la grasa subcutánea truncal, podría tener un gran impacto sobre los factores de riesgo, más que la grasa visceral, debido a su gran tamaño.

Enfermedad cardiovascular y obesidad, en particular obesidad visceral, se asocian a una edad relativamente temprana del desarrollo (McGill HC Jr et al. 2002). El aumento que se está produciendo en la prevalencia de obesidad, está íntimamente ligado a la resistencia a insulina así como a la incidencia de síndrome metabólico y diabetes tipo 2 (Tabla 2). La resistencia a insulina es primaria en la etiología de la diabetes tipo 2, y a su vez estaría ligada a la amplia serie de anormalidades metabólicas presentes en el síndrome metabólico, como hipertensión, hiperlipidemia, aterosclerosis, etc. (Kahn BB & Flier JS. 2000). El término resistencia a insulina significa resistencia a los efectos de la insulina sobre la captación, metabolismo, o

---

**Factores de riesgo cardiovascular asociados con obesidad visceral**


---

- Resistencia a insulina / hiperinsulinemia
  - Niveles bajos de HDL-C y altos de triglicéridos en suero
  - Concentraciones séricas aumentadas de Apolipoproteína B
  - Pequeñas partículas densas de LDL
  - Concentraciones séricas de fibrinógeno y PAI-1 aumentadas
  - Incremento en suero de los niveles de proteína C reactiva
  - Producción aumentada de TNF- $\alpha$  e IL-6
  - Aumento en la viscosidad de la sangre
  - Hipertrofia ventricular izquierda
  - Aterosclerosis prematura
- 

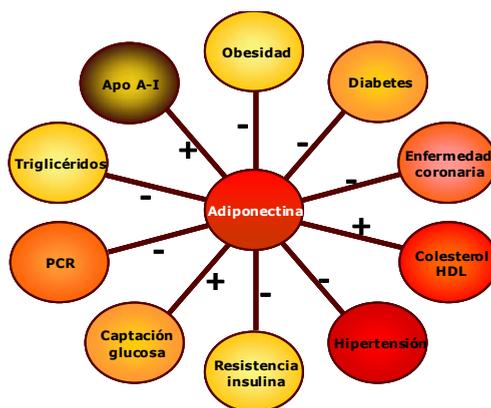
**Tabla 2. Principales factores asociados a obesidad implicados en el aumento de riesgo cardiovascular.**

almacenamiento de la glucosa. La acción de la insulina consiste en disminuir los niveles de glucosa a consecuencia de suprimir la producción de glucosa hepática y aumentar la captación de glucosa en músculo y grasa. Por tanto, la resistencia a insulina en obesidad y diabetes tipo 2, supone una disminución en el transporte y metabolismo de la glucosa de adipocitos y músculo esquelético; y un empeoramiento en la supresión de la liberación de glucosa hepática (Kahn BB & Flier JS. 2000). Esta disfunción vendría dada, en parte, por un empeoramiento en la señalización de la insulina en los tejidos diana, y una disminución de la expresión del principal transportador de glucosa activado por insulina GLUT4 (Kahn BB & Flier JS. 2000). Este último factor es el principal determinante en el empeoramiento del transporte de glucosa en adipocitos. Sin embargo, en músculo esquelético de obesos y diabéticos, la expresión de GLUT4 es normal, siendo el causante del empeoramiento en el transporte, un fallo en la translocación o fusión de las vesículas de GLUT4 con la membrana plasmática (Kahn BB & Flier JS. 2000). Recientemente se ha demostrado como resistencia a insulina en cardiomiocitos, al igual que en músculo esquelético, está asociada a un empeoramiento en la translocación del transportador GLUT4 (Rosenblatt-Velin N et al. 2004).

### **8.2. Regulación de los niveles de adiponectina en plasma y tejido adiposo por factores de riesgo cardiovascular**

Hu E et al. (1996), encontraron que los niveles de expresión del transcritto de adiponectina estaban disminuidos en el tejido adiposo de ratones obesos ob/ob frente al de ratones de cepa salvaje. Posteriormente un trabajo realizado en humanos, demostró que los

niveles plasmáticos de adiponectina estaban disminuidos en pacientes obesos frente a pacientes sin sobrepeso (Arita Y et al. 1999). Este dato era sorprendente porque contrastaba con las otras adipocitoquinas, cuyos niveles están aumentados en obesidad de forma proporcional al aumento de la masa grasa corporal. Por otro lado, se ha comprobado como una disminución del peso corporal va acompañado de un aumento de adiponectina en plasma (Berg AH et al. 2001, Yang WS et al. 2001). Durante la etapa adulta, la obesidad se caracteriza por una hipertrofia de los adipocitos, consistente en un aumento del tamaño de éstos, lo que deriva en la secreción de una serie de sustancias causantes de resistencia a insulina (Kadowaki T et al. 2003). Otro estudio presentado por Hotta K et al. (2000), mostró que los pacientes diabéticos presentaban unos niveles de adiponectina menores que los no diabéticos, y que éstos eran particularmente bajos en individuos con enfermedad coronaria (coronary artery disease, CAD), lo que sugiere una posible unión con aterosclerosis (Figura 12).



**Figura 12. Factores reguladores de los niveles plasmáticos de adiponectina.**

En otro trabajo publicado por Hotta K et al. (2001), se estudiaron los niveles de adiponectina durante la progresión de diabetes tipo 2, utilizando para ello un modelo animal, en monos rhesus, predispuesto a desarrollar resistencia a insulina. Estos autores encontraron que los niveles de adiponectina disminuían en paralelo a la progresión de la diabetes. Los niveles de adiponectina se correlacionaron negativamente con peso corporal, peso graso corporal y niveles de insulina en reposo; y se correlacionaron positivamente con la captación de glucosa mediada

por insulina. Esto quiere decir que el desarrollo de hiperinsulinemia es un posible mecanismo supresor de adiponectina. Estos resultados fueron corroborados en humanos por un estudio cuyas conclusiones fueron que una disminución en los niveles de adiponectina (hipoadiponectinemia) tienen una mayor relación con resistencia a insulina e hiperinsulinemia que con otros parámetros metabólicos como obesidad y tolerancia a glucosa (Weyer C et al. 2001). Un estudio muy claro fue el desarrollado en los indios Pima de Arizona. Esta población tiene la prevalencia de diabetes tipo 2 más alta conocida, y en ella, la resistencia a insulina se asocia a concentraciones bajas de adiponectina. Los resultados de este estudio muestran como los pacientes presentan niveles de adiponectina disminuidos frente a los controles, y que los individuos con concentraciones más bajas son más propensos a desarrollar diabetes tipo 2 que los individuos con mayores concentraciones (Lindsay RS et al. 2002). Tomados en conjunto, estos resultados estarían sugiriendo que niveles disminuidos de adiponectina en plasma podrían estar contribuyendo en la patogénesis de la resistencia a insulina y diabetes tipo 2. Sin embargo, la hiperinsulinemia por sí sola no parece ser responsable de los niveles disminuidos de adiponectina, ya que en estadios tardíos de diabetes tipo 2, donde los niveles de insulina circulantes están disminuidos, la adiponectina permanece disminuida (Figura 12).

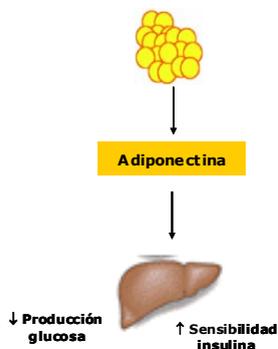
La relación existente entre adiponectina y la concentración sérica de lípidos también se ha estudiado. Existe correlación negativa entre los niveles circulantes de adiponectina y de triglicéridos, mientras que ésta se presenta positiva con los niveles de colesterol HDL, en pacientes con diabetes tipo 2 (Hotta K et al. 2000). El trabajo presentado por Matsubara et al. (2002), realizado sobre una serie de mujeres no diabéticas con dislipemia, demostró una correlación negativa de concentraciones plasmáticas de adiponectina con el nivel de triglicéridos, el índice aterogénico (colesterol total/ colesterol HDL) y apolipoproteínas B y E; mientras que correlacionaba positivamente con niveles séricos de colesterol HDL y apolipoproteínas A-I. Estos resultados plantean una asociación entre los niveles bajos de adiponectina (hipoadiponectinemia) y factores ateroscleróticos involucrados en el desarrollo de síndrome metabólico (Figura 12).

Atendiendo a todos estos datos, parece claro que los niveles de adiponectina guardan relación con la probabilidad de desarrollar enfermedad cardíaca. Se ha comprobado que niveles plasmáticos de adiponectina correlacionan negativamente con los niveles de proteína C reactiva (PCR) (Ouchi N et al. 2003). Ratones deficientes en adiponectina presentan una expresión elevada de PCR, lo que indica que adiponectina regula negativamente la expresión de esta proteína (Ouchi N et al. 2003). Por su parte, un trabajo presentado por Pischon T et al. (2004), muestra que concentraciones elevadas de adiponectina se asocian con un menor riesgo de sufrir infarto de miocardio en varones. También se ha demostrado que el hecho de presentar hipoadiponectinemia supone un factor de riesgo independiente para sufrir hipertensión (Iwashima Y et al. 2004), y que los niveles de adiponectina están disminuidos en pacientes con hipertensión arterial (Adamczak M et al. 2003) (Figura 12).

## 9. Efectos metabólicos de adiponectina

### 9.1. Metabolismo de la glucosa

Son varios los estudios que han puesto de manifiesto una clara relación entre adiponectina e insulina. Así, en el año 2001, Berg AH et al., publicaron un trabajo desarrollado en ratones salvajes, ratones ob/ob (obesos y diabéticos tipo 2), y ratones NOD (no obesos y diabéticos tipo 1), con claras diferencias en los niveles de insulina entre unos y otros. En todos



**Figura 13. Adiponectina disminuye la síntesis hepática de glucosa, lo que confiere un efecto sensibilizador a insulina.**

estos animales la inyección de la forma larga de adiponectina, sintetizada en mamíferos, producía una disminución significativa de los niveles de glucosa de forma independiente a los niveles de insulina. La conclusión extraída de este trabajo es que los efectos de la adiponectina no parecen estar mediados por un aumento de insulina en plasma. El mecanismo subyacente en todos los modelos al efecto de la adiponectina es el mismo: lograr la

sensibilización del hígado a la insulina circulante (Figura 13). Este mecanismo fue demostrado en este trabajo por una serie de experimentos realizados *in vitro* con hepatocitos aislados. La

administración de adiponectina ejercía un efecto sensibilizador a insulina sobre los hepatocitos, de forma que se producía una supresión hepática de la liberación de glucosa. Efectos muy similares a estos fueron presentados por Yamauchi T et al. (2001), con un trabajo en modelos murinos de obesidad, diabetes y lipoatrofía. Utilizando ratones con diabetes lipoatrófica, donde no hay adiponectina en suero, vieron como la infusión de adiponectina mejoraba de forma significativa la hiperglucemia e hiperinsulinemia. Este efecto era mayor para la adiponectina globular que para la forma larga. Posteriormente, utilizando dos modelos de diabetes tipo 2 caracterizados por presentar obesidad, hiperlipidemia, resistencia a insulina e hiperglucemia, observaron que la infusión continua de bajas dosis de adiponectina, recuperaba los niveles de ésta, hecho que mejoraba de forma significativa la hiperglucemia inducida por una dieta rica en grasas y la hiperinsulinemia. En este mismo sentido Combs TP et al. (2001), presentaron un trabajo *in vivo* donde la infusión de adiponectina forma larga se realizaba a ratones conscientes durante un clampaje pancreático euglicémico. Este modelo permite mantener de forma controlada y en un rango fisiológico los niveles de insulina. El resultado fue que dicha infusión disminuía la producción hepática de glucosa en un 65%, siendo este el mecanismo por el cual adiponectina disminuye la concentración de glucosa en plasma. Además este efecto de la adiponectina estaba acompañado por una disminución de la expresión en el hígado de los ARNm de dos enzimas gluconeogénicas, G6Pasa y PEPCK (fosfoenol piruvato carboxiquinasa). Esto sugiere que la regulación transcripcional de estas dos enzimas podría contribuir al mecanismo de acción de la adiponectina. Todos estos resultados obtenidos en modelos animales, abogan por un efecto antidiabético de la adiponectina, y demuestran claramente la relación que se suponía entre adiponectina e insulina en los estudios epidemiológicos.

Esta misma idea ha sido contrastada mediante estudios realizados a nivel celular. Así, los trabajos presentados por Maeda N et al. (2002), y Yamauchi T et al. (2002), mostraron como la administración de adiponectina a miocitos de músculo esquelético C2C12, tenía un claro efecto inductor de la captación celular de glucosa. Los resultados mostraron una estimulación de la captación basal de glucosa y de la inducida por insulina. Este mismo efecto se ha contrastado

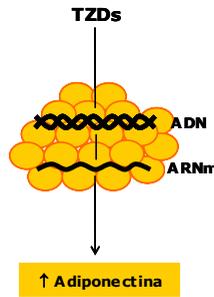
en un trabajo desarrollado sobre adipocitos, donde la adiponectina fue capaz de estimular la captación de glucosa (Wu X et al. 2003). De forma similar, se ha comprobado que la incubación del músculo extensor en presencia de adiponectina induce un aumento en la captación de glucosa por parte de éste (Tomas E et al. 2002).

Que la adiponectina es un importante regulador de la sensibilidad a insulina, también se ha puesto de manifiesto mediante la generación de ratones deficientes en adiponectina (*knockout*). La reducción parcial de la expresión del gen de adiponectina (ratones *adipo*<sup>+/-</sup>) supuso un grado medio de resistencia a insulina respecto a ratones salvajes, y la supresión total de la expresión del gen (ratones *adipo*<sup>-/-</sup>) supuso una resistencia mucho mayor que la del ratón *adipo*<sup>+/-</sup>. Esto se determinó observando que los efectos de la insulina estaban alterados de manera significativa en los ratones deficientes homocigotos respecto a los heterocigotos y los salvajes. Estos resultados suponen la constatación de que la acción de la adiponectina es necesaria para una regulación normal de la sensibilidad a insulina y la homeostasis de la glucosa *in vivo* (Kubota N et al. 2002).

#### **9.1.1. Tiazolidinedionas y adiponectina**

La extensa utilización de las tiazolidinedionas (TZDs) como tratamiento de la resistencia a insulina y diabetes, y los resultados obtenidos a partir de ello, han permitido ahondar en la estrecha unión que presentan los niveles de adiponectina y la resistencia a insulina. Las TZDs son drogas sensibilizadoras a insulina que mejoran la resistencia a insulina y disminuyen los niveles en plasma tanto de insulina como de glucosa. Esto se ha determinado mediante el uso de modelos genéticos de obesidad. El PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor) es un factor de transcripción activado por ligando, implicado en la regulación de la diferenciación de adipocitos y de múltiples genes de éstos. Se ha comprobado que la administración de TZDs es capaz de aumentar las concentraciones plasmáticas de adiponectina en ratones y humanos resistentes a insulina, y en individuos con diabetes tipo 2. Así, Maeda N et al. (2001), vieron como el tratamiento con TZDs era capaz de normalizar y aumentar la expresión del ARNm de adiponectina en el tejido adiposo de ratones obesos. En este mismo estudio, el tratamiento de adipocitos cultivados con TZDs aumentó la expresión del ARNm y la

secreción al medio de adiponectina de forma dosis y tiempo dependiente (Figura 14). La acción de las TZDs sobre la expresión de adiponectina está mediada por un aumento de la actividad del promotor del gen de ésta (Maeda N et al. 2001), aunque no está claro que en el gen de adiponectina exista un elemento de respuesta a PPAR- $\gamma$ . Parece ser que la acción de PPAR sobre la acción específica sobre el PPAR (Barth N et al. 2002). Tanto el estudio de Maeda N et al. (2001), como el estudio de Combs TP et al. (2002), muestran que los niveles plasmáticos de adiponectina se ven afectados por agonistas PPAR- $\gamma$  en ratones obesos y normales. Combs TP et al., encontraron que el tratamiento con agonistas PPAR- $\gamma$  aumentó los niveles plasmáticos de adiponectina en ratones obesos y diabéticos (db/db), y de forma similar en un modelo no genético de diabetes tipo 2. Asimismo, en pacientes que presentaban una resistencia a insulina severa, asociada con una mutación en PPAR- $\gamma$  dominante negativa, los niveles de adiponectina estaban disminuidos 5 veces. El hecho de que adiponectina mejore la tolerancia a la glucosa debido a su efecto sensibilizador a insulina, permite pensar que el efecto que las TZDs tienen sobre la expresión de adiponectina pueda ser responsable, al menos de forma parcial, de la acción hipoglucemiante que éstas ejercen sobre pacientes con diabetes tipo 2.



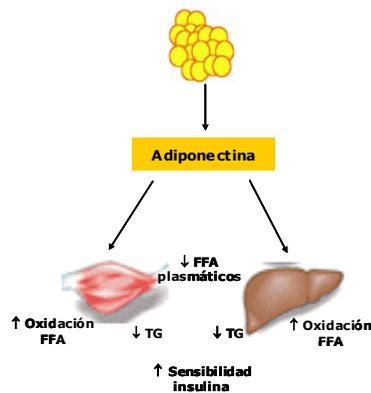
**Figura 14.** Los fármacos antidiabéticos tiazolidinedionas (TZDs) aumentan la expresión del ARNm y la síntesis de adiponectina.

## 9.2. Metabolismo de lípidos

Los efectos reductores de la adiponectina sobre la resistencia a insulina (efectos antidiabéticos) en ratones obesos se han relacionado con una disminución de los niveles de ácidos grasos en plasma y del contenido de triglicéridos en músculo e hígado. (Fruebis J et al. 2001, Yamauchi T et al. 2001). Se sabe que un aumento en el contenido de ácidos grasos dentro de un tejido deriva en un estado de resistencia a insulina. Este hecho se debe a alteraciones en la vía de señalización de la insulina, que deriva en problemas en la translocación de los

transportadores de glucosa (GLUT4) a la membrana plasmática, lo que supone una deficiencia en la captación de glucosa (Shulman GI. 2000). Fruebis J et al. (2001), utilizaron como modelo de estudio ratones alimentados con una dieta rica en grasas y azúcares. En estos animales la inyección de adiponectina globular disminuyó de forma significativa los niveles en plasma de ácidos grasos libres (FFAs), glucosa y triglicéridos (el efecto de la forma larga de adiponectina fue menor sobre los ácidos grasos y no detectable sobre la glucosa), de forma independiente a cambios en los niveles de leptina, insulina o glucagón. La disminución en los niveles de ácidos grasos libres se explicó diciendo que la adiponectina aumenta la eliminación de éstos de la circulación promoviendo la captación celular. Además, Fruebis J et al., vieron que la administración de adiponectina globular producía una reducción de peso de forma significativa en ratones alimentados con un dieta rica en grasas, y que cuando esta administración era crónica, la ganancia de peso se prevenía. La explicación de estos resultados la obtuvieron al demostrar que la hormona era capaz de incrementar la oxidación mitocondrial de ácidos grasos en el músculo.

Estos resultados permiten especular que si la adiponectina disminuye los niveles plasmáticos de FFAs y aumenta la oxidación de ácidos grasos en el músculo, también puede reducir el efecto inhibitorio que los FFAs tienen sobre la señalización de la insulina en este tejido (Figura 15). Esta hipótesis quedó demostrada al observarse que la administración de



**Figura 15. Adiponectina reduce los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres y aumenta la oxidación de estos en el músculo esquelético e hígado, disminuyendo así el contenido de triglicéridos. Esto confiere un efecto sensibilizador a insulina.**

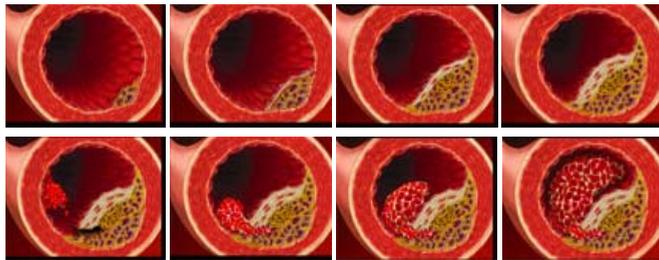
adiponectina a ratones lipoatróficos aumentaba la fosforilación del receptor de insulina y del substrato 1 del receptor (IRS-1) en músculo esquelético (Yamuchi T et al. 2001). El efecto sobre la señalización de la insulina estaba mediado por una disminución en el contenido en el tejido de triglicéridos tras la administración de adiponectina. Además, esta disminución de los triglicéridos se debía a un aumento en la expresión de moléculas implicadas en el transporte de ácidos grasos (CD36), combustión de la energía (ACO), y disipación de la misma (UCP2) (Yamauchi T et al. 2001). Estos resultados validan la explicación planteada por Fruebis J et al., sobre la captación celular de los ácidos grasos. Curiosamente, aunque el efecto final de la adiponectina sobre el hígado era disminuir la resistencia a insulina, lo hacía de forma distinta respecto al músculo esquelético. Es decir, en hígado también se disminuía el contenido de triglicéridos, pero no era debido a un aumento de la expresión de moléculas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos. En este caso el efecto fue el contrario, hubo una disminución de la expresión de moléculas implicadas en el transporte de ácidos grasos, con lo que la entrada de éstos se vio disminuida (Yamauchi T et al. 2001). Por último, y en concordancia con los resultados de Fruebis J et al., Yamauchi T et al., demostraron un incremento en la oxidación de los ácidos grasos en el músculo, pero no en hígado, de ratones diabéticos tipo 2 y obesos. Esto disminuye el contenido de triglicéridos y se asocia a una bajada de los niveles séricos de los mismos.

La creación de ratones *knockout* para el gen de adiponectina aportó nuevos datos sobre el papel de la adiponectina en el metabolismo de lípidos y resistencia a insulina (Maeda N et al. 2002). Este ratón presentaba un catabolismo de los ácidos grasos libres alterado. La expresión en músculo esquelético del ARNm de FATP-1, transportador de ácidos grasos, estaba disminuida respecto a ratones salvajes. Al someter a estos ratones a una dieta rica en grasas y azúcares, las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina eran significativamente mayores que las de un ratón de cepa salvaje. Esto significaba que el grado de resistencia a insulina era mayor, acompañado de concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres mayores. La sobreexpresión de adiponectina mediante infección con un adenovirus, disminuyó de forma acusada los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y ácidos grasos libres. La sobreproducción de

adiponectina mejoró la ya empeorada sensibilidad a insulina del ratón *knockout* tratado con una dieta rica en grasas y azúcares (Maeda N et al. 2002).

### 10. Propiedades anti-aterogénicas y anti-inflamatorias de adiponectina

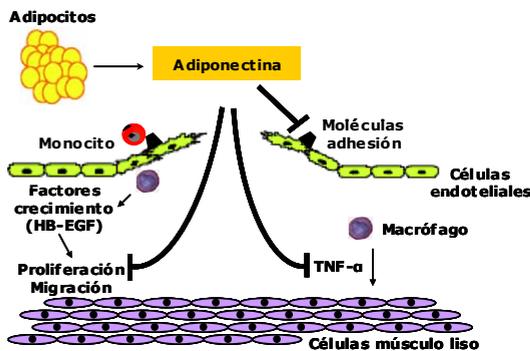
La aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria. Las lesiones ateroscleróticas en un primer momento se originan por la activación de las células endoteliales a través de una serie de estímulos inflamatorios, como puede ser el TNF- $\alpha$  (Ouchi N et al. 1999). Esta activación va a desencadenar la expresión de las llamadas moléculas de adhesión. Se ha visto que la expresión de dichas moléculas desempeña un papel muy importante en la regulación de reacciones inflamatorias en diversos tipos celulares. La aparición de las moléculas de adhesión va a producir un aumento en la adherencia de los monocitos circulantes (Ross R. 1993). La adhesión de los monocitos al endotelio arterial se considera un proceso fundamental en el desarrollo de enfermedades vasculares (Ross R. 1993) (Figura 16).



**Figura 16. Representación sobre un corte transversal de una arteria del proceso de desarrollo de aterosclerosis.**

Son muchos los trabajos acerca de las propiedades anti-aterogénicas y anti-inflamatorias de la adiponectina. La posible relación entre adiponectina y aterosclerosis se planteó inicialmente al observarse que las concentraciones plasmáticas de adiponectina estaban disminuidas en pacientes con enfermedad coronaria (CAD) (Ouchi N et al. 1999, Hotta K et al. 2000). El desarrollo de estudios inmunohistológicos ha permitido determinar que la adiponectina plasmática se une a las paredes vasculares cuando el endotelio está dañado (Okamoto Y et al. 2000). En otra serie de estudios *in vitro*, se mostró como dosis fisiológicas de adiponectina eran capaces de inhibir la adhesión de monocitos al endotelio inducida por TNF- $\alpha$  y la expresión de moléculas de adhesión, tales como la molécula de adhesión vascular-1

(VCAM-1), E-selectina y la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) (Ouchi N et al. 1999). Este resultado permite pensar que si adiponectina es capaz de regular la respuesta inflamatoria, también podría prevenir procesos ateroscleróticos. También se ha comprobado que es capaz de suprimir los cambios inflamatorios inducidos por  $\text{TNF-}\alpha$  en células endoteliales, modulando la actividad del factor nuclear  $\kappa\text{B}$  ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ), un factor de transcripción involucrado en la respuesta inflamatoria (Ouchi N et al. 2000). Además se ha visto que adiponectina no sólo es capaz de inhibir la acción de  $\text{TNF-}\alpha$ , sino que también inhibe su producción (Yokota T et al. 2000). Este mismo estudio demuestra que adiponectina inhibe la capacidad fagocítica de los macrófagos adultos. Otro trabajo *in vitro* presentado por Ouchi N et al. (2001), mostró la capacidad de esta hormona para suprimir la transformación celular de macrófago a célula



**Figure 17. Mecanismos moleculares de las acciones antiaterogénicas de adiponectina.**

espongiforme inducida por  $\text{TNF-}\alpha$ , inhibiendo la secreción de éste por parte de los macrófagos monocito. Todos estos estudios ponen de manifiesto las propiedades anti-inflamatorias de la adiponectina, y que ésta actuaría como un factor anti-aterosclerótico sobre las células del endotelio (Figura 17).

A este respecto, se han desarrollado trabajos *in vivo* mediante la utilización de modelos de ratón. Un trabajo muy interesante fue el publicado por Maeda N et al. (2002). Estos investigadores desarrollaron un ratón *knockout* para adiponectina, en el que vieron que la expresión de ARNm de  $\text{TNF-}\alpha$ , en tejido adiposo, estaba aumentada respecto a ratones salvajes. Este aumento en la expresión del ARNm estaba acompañado por un aumento de las concentraciones plasmáticas de  $\text{TNF-}\alpha$ . Cuando estos ratones se infectaron con un adenovirus capaz de producir adiponectina, los niveles de  $\text{TNF-}\alpha$ , tanto de ARNm como de proteína

disminuyeron. Por otro lado, ratones deficientes en adiponectina presentan un engrosamiento severo de la neointima (Matsuda M et al. 2002, Kubota N et al. 2002) y un daño arterial muy grave, acompañado por un incremento en la proliferación de las células del músculo liso vascular. La administración de adiponectina exógena inhibe este engrosamiento, es decir, atenúa la proliferación de la neointima, devolviendo los niveles a los de un ratón salvaje (Matsuda M et al. 2002). La utilización de ratones deficientes en apolipoproteína E (apo E<sup>-/-</sup>), ha sido de gran ayuda a la hora de elucidar el papel de adiponectina sobre aterosclerosis. Estos ratones se utilizan como modelos experimentales de aterosclerosis *in vivo*, ya que desarrollan hiperlipidemia y lesiones vasculares similares a aterosclerosis en humanos. La infección de estos ratones con un adenovirus recombinante, que codifica para adiponectina, conseguía un cambio significativo en la expresión de ésta. Dicha sobre-expresión de adiponectina, derivaba en una supresión de la progresión de las lesiones ateroscleróticas de los ratones (Okamoto Y et al. 2002). Otro modelo de estudio utilizado fue el de ratones transgénicos que expresan el dominio globular de adiponectina. Para determinar el efecto que la hormona tiene sobre la aterosclerosis, estos ratones fueron cruzados con ratones apoE<sup>-/-</sup>. El efecto encontrado fue que la sobre-expresión de adiponectina en estos ratones suponía una atenuación en la formación de las lesiones, disminuyendo la progresión de la aterosclerosis. Esta mejoría se debía a una disminución de la expresión del receptor *scavenger* de clase A y TNF- $\alpha$ , lo que supone una reducción en la acumulación de lípidos e inflamación de los macrófagos de la pared vascular (Yamauchi T et al. 2003b). Estos trabajos por tanto presentan evidencias claras, *in vivo*, de que la adiponectina está desempeñando un papel protector frente a la aterosclerosis.

---

<b>Efectos celulares de la adiponectina a nivel vascular</b>
<b>Supresión de aterosclerosis</b>
<b>Suprime la expresión de receptores "scavenger" de las moléculas de adhesión vasculares</b>
<b>Reduce los niveles de TNF-<math>\alpha</math> y suprime los efectos inflamatorios de éste sobre la función endotelial</b>
<b>Atenúa los efectos de factores de crecimiento sobre células de músculo liso</b>
<b>Inhibe efectos del LDL oxidado en células endoteliales, como suprimir la proliferación y la generación de superóxido</b>
<b>Estimula la angiogénesis</b>
<b>Reduce el engrosamiento de la neointima y la proliferación de células de músculo liso en arterias dañadas</b>
<b>Inhibe la proliferación y migración de células endoteliales</b>

---

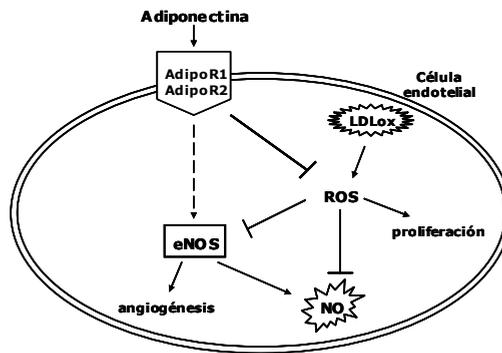
Tabla 3. Principales acciones anti-aterogénicas y anti-inflamatorias de adiponectina a nivel vascular.

## 11. Efectos de la adiponectina sobre la producción de óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) ha sido identificado como un factor derivado del endotelio capaz de inducir relajación, siendo por tanto un potente vasodilatador (Sarkar D et al. 2001). Además de su acción vasodilatadora en los vasos sanguíneos, diversos trabajos muestran su posible papel como molécula reguladora de la función cardíaca (Sarkar D et al. 2001). La síntesis de ON endógeno ocurre a partir de la oxidación secuencial de L-arginina. En este proceso va a intervenir una familia de proteínas que son las sintasas de óxido nítrico, las cuales utilizan NADPH y oxígeno como co-substrato. Existen tres sintasas de óxido nítrico: 1) la sintasa neuronal (nNOS) o tipo I, la sintasa endotelial (eNOS) o tipo III, y la sintasa inducible (iNOS) o tipo II. Las dos primeras se expresan de forma constitutiva y sintetizan ON en respuesta a un aumento de  $Ca^{2+}$ . La sintasa inducible libera ON en mayor concentración y su inducción en ciertos tejidos se da en respuesta a estímulos inflamatorios, y su actividad es independiente de  $Ca^{2+}$  (Sarkar D et al. 2001).

Los efectos de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa obedecen en parte al efecto inductor de ésta sobre la producción de óxido nítrico en células endoteliales (Chen H et al. 2003). Ya que adiponectina presenta acciones metabólicas muy similares a las de la insulina, los primeros estudios realizados a este respecto, trataron de determinar si adiponectina era capaz de inducir la producción de óxido nítrico. Esta hipótesis de trabajo se apoyaba en el hecho de que ratones *knockout* para la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS), desarrollaban hipertensión, resistencia a insulina, e hiperlipidemia (Duplain H et al. 2001). Los primeros trabajos indicaban que adiponectina, tanto la forma larga como la globular, era capaz de inducir la producción de ON en células endoteliales vasculares y aórticas (Chen H et al. 2003, Hattori Y et al. 2003). Este incremento en la producción de ON se debía a la activación, mediante fosforilación, de eNOS. Un estudio reciente muestra que la hipoadiponectinemia se asocia a un empeoramiento en la vasodilatación dependiente de endotelio, de forma independiente a la diabetes mellitus (Tan KC et al. 2004), y ensayos realizados *in vitro* mostraron que la adiponectina producía un incremento significativo en la producción de óxido nítrico por parte de células endoteliales (Tan KC et al. 2004). La adiponectina presenta además propiedades

protectoras sobre el endotelio vascular. El trabajo desarrollado por Motoshima H et al. (2004), muestra como la adiponectina es capaz de aumentar la actividad de eNOS inhibida por el tratamiento con LDL oxidado de células endoteliales. Además es capaz de inhibir la proliferación y síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) en estas células (Motoshima H et al. 2004) (Figura 18). Por último, la asociación beneficiosa entre adiponectina y síntesis de óxido nítrico, ha sido puesta nuevamente de manifiesto al demostrarse que adiponectina inhibe la apoptosis inducida en células endoteliales por el tratamiento con angiotensina II mediante la activación de eNOS (Lin LY et al. 2004).



**Figura 18. Acciones de adiponectina sobre células endoteliales. Estimulación de la síntesis de óxido nítrico.**

Por tanto, teniendo en cuenta la estrecha relación existente entre la regulación de los niveles de adiponectina y los distintos factores de riesgo que conducen al desarrollo de enfermedad cardiovascular, así como el hecho de que adiponectina se expresa en tejidos distintos al adiposo, esto nos lleva a plantear la hipótesis de que puedan existir mecanismos autocrinos/paracrinos de regulación de la viabilidad y el metabolismo cardiomiocitario por parte de esta hormona.

## **OBJETIVOS ADIPONECTINA**



Los objetivos principales de este trabajo han sido:

1. Determinar la posible expresión génica, síntesis y secreción de adiponectina en cardiomiocitos, así como la expresión y síntesis de sus receptores, AdipoR1 y AdipoR2.
2. Analizar si adiponectina es capaz de regular la viabilidad y metabolismo de los cardiomiocitos.
3. Determinar el efecto de adiponectina sobre el estado de activación de AMPK en cardiomiocitos.



## **MATERIAL Y MÉTODOS ADIPONECTINA**



## **1. Cultivos celulares**

### **1.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata**

Ver apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento.

### **1.2. Línea celular HL-1 de ratón**

Ver apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento.

### **1.3. Cultivo primario de cardiomiocitos humanos**

Realizado a partir del apéndice atrial derecho de pacientes del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela sometidos a cirugía cardíaca. Previamente a la cirugía, los pacientes firmaron un consentimiento informado. Durante la cirugía de bypass coronario se realiza una cateterización del atrio derecho para lo cual se realiza una sección de éste. Dicha sección, que normalmente se desecha, es la utilizada para la realización del cultivo.

El apéndice atrial u orejuela se seccionó en pequeñas porciones que se lavaron en tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente se realizaron 5 digestiones enzimáticas en un volumen de 1ml por cada digestión.

La solución enzimática estaba compuesta por 0.25% de tripsina en polvo (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), 0.15% de colagenasa (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) y 0.02% de glucosa disueltas en tampón PBS (NaCl, 0.15 M). La primera de las digestiones, la cual se descarta, fue de 10 minutos, y las cuatro siguientes de 5 minutos.

Para la obtención de las células, los sobrenadantes se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm a 23-25 °C. Las células se resuspendieron en medio Iscove's modified Dulbecco's (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% suero bovino fetal, 0.1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) y antibióticos. La siembra de las células se realizó sobre superficies tratadas con fibronectina.

## **2. Técnicas utilizadas**

### **2.1. Extracción de ARN mediante TRIzol®**

Ver apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento.

## **2.2. Tratamiento con DNAsas**

Ver apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento.

## **2.3. Extracción fenol:cloroforno:alcohol isoamílico**

Ver apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento.

## **2.4. Retrotranscripción (RT)**

Ver apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento.

## **2.5. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Ver apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento.

Los cebadores utilizados en cada una de las reacciones, así como las condiciones de amplificación de los mismos quedan reflejadas en las Tablas 1 y 2 respectivamente.

## **2.6. Western Blot**

### **AMPK:**

Se realizó un estudio sobre la posible activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) por parte de adiponectina en células HL-1. La activación de esta proteína depende de su estado de fosforilación.

Para ello,  $5 \times 10^5$  células se privaron de suero durante 12 horas en medio ExCell A+B y se trataron con adiponectina recombinante de ratón (BioCat GmbH, Heidelberg, Alemania) a una dosis de  $10 \mu\text{g/ml}$  durante 5, 30 y 120 minutos, con el fin de realizar un estudio tiempo-respuesta.

### **iNOS:**

Se estudió si el tratamiento con adiponectina sobre cardiomiocitos neonatales de rata era capaz de inducir la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). El estudio se dividió en dos partes.

En un primer momento se realizó un estudio dosis-respuesta en el que se trataron las células con dosis crecientes de adiponectina recombinante de rata (BioCat GmbH, Heidelberg, Alemania). Para ello, se sembraron  $9 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 24. Tras 12 horas de privación de suero en DMEM, la adiponectina se administró a dosis  $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $5 \mu\text{g/ml}$  y  $10 \mu\text{g/ml}$  durante 24 horas. Dentro de estos experimentos, se incorporó el tratamiento con un

inhibidor específico de la actividad de la sintasa, aminoguanidina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). La administración de aminoguanidina (1mM) se realizó 2 horas antes del tratamiento con adiponectina, y estuvo presente durante todo el tiempo de tratamiento con la hormona. Los medios de cultivo de estos experimentos se recogieron para la determinación de la producción de nitritos.

En una segunda serie de experimentos, se realizó un estudio tiempo-respuesta a la dosis de 10 µg/ml. En este caso,  $9 \times 10^4$  células se sembraron por pocillo. Tras 12 horas de serodeprivación en DMEM, las células se trataron con adiponectina durante 6, 12, 24 y 48 horas. Los medios de cultivo de estos experimentos se recogieron para la determinación de la producción de nitritos.

Transcurridos los tiempos de tratamiento la reacción se detuvo en hielo y lavando las células con PBS frío (4-8 °C). El lisado celular se realizó añadiendo 50µl de solución de lisis (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 250 mM NaF, 30 mM Pirofosfato sódico, 0.5 M EDTA, 10 µg/ml aprotinina, y 10 µg/ml leupeptina). Para facilitar la lisis se raspó la superficie de la placa de cultivo.

Los lisados se transfirieron a tubos de polipropileno y se incubaron en hielo durante 15-20 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugaron a 14000 rpm 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se realizó la cuantificación de la proteína mediante Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrabe, Munchen).

En los ensayos de AMPK, 80 µg de proteína mezclada con un tampón de carga (glicerol, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol) se separaron mediante electroforesis en un gel de acrilamida al 10% SDS-PAGE (10% acrilamida, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% Amonipersulfato y Temed). En el caso de los ensayos de iNOS, en la electroforesis se utilizaron 40 µg de proteína que se separaron en un gel al 8% de acrilamida SDS-PAGE (8% acrilamida, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% Amonipersulfato y Temed). A continuación, se transfirió la proteína a membranas de PVDF (Hybond, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania) durante 60 minutos a 90 voltios. Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 2 horas en tampón TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 0.1% Tween 20) con 5%

de leche en polvo desnatada, y se incubaron toda la noche a 4 °C con un anticuerpo anti-fosfo-AMPK de conejo ( $\alpha$ -pAMPK, 1:1000) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA), o con un anticuerpo anti-iNOS de conejo ( $\alpha$ -iNOS, 1  $\mu$ g/ml) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), según el caso, resuspendidos en la solución de bloqueo. Tras la incubación con el primer anticuerpo, las membranas se lavaron en TBS-T y se incubaron con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron y revelaron con el reactivo ECL-plus para fosfo-AMPK, y con ECL para iNOS, siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania).

Con el fin de comprobar las posibles diferencias de carga entre las muestras, las membranas se limpiaron con la solución “Stripping” (ver apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento), se bloquearon de nuevo en TBS-T + 5% leche en polvo durante 2 horas a temperatura ambiente, y se incubaron con un anticuerpo anti-AMPK (1:1000; Cell Signaling Technology, Inc.), y con un anticuerpo anti-beta actina (1:2000; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), según el caso, resuspendidos en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C. En este caso el revelado se realizó con el reactivo ECL normal.

La cuantificación proteica se realizó mediante densitometría de las bandas en un escáner Typhoon 9410 Documentation System (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania), lo que determinó un valor numérico con el cual se pudo hacer la estadística de los experimentos realizados. Los valores obtenidos al densitometrar las placas  $\alpha$ -pAMPK se corrigieron por los valores obtenidos en las placas  $\alpha$ -AMPK, de esta forma se pudo cuantificar la diferencia de activación de AMPK entre los distintos tratamientos y frente al control.

## **2.7. Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica**

La posible síntesis de adiponectina por cardiomiocitos aislados tanto HL-1 como humanos, así como la de los receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2), se analizó mediante inmunocitoquímica. La inmunohistoquímica se realizó sobre tejidos utilizados como control positivo.

Ambos tipos celulares se sembraron sobre portaobjetos (Dako Cytomation) tratados con

fibronectina a densidades bajas que permitieron ver las células de forma individualizada. Una vez pegadas, las células se fijaron en formaldehído tamponado (PBF; 4% formaldehído en tampón fosfato pH 7.4). Los tejidos utilizados como controles se fijaron en PBF de 18 a 24 horas, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$ . Estas secciones se montaron sobre portaobjetos adhesivos Histobond (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania), se desparafinaron y se rehidrataron.

Los controles positivos utilizados fueron:

- i. Expresión de adiponectina: tejido adiposo tanto de ratón como de rata
- ii. Expresión de AdipoR1: músculo estriado de ratón y rata
- iii. Expresión de AdipoR2: hígado de ratón y rata

### **2.7.1. Inmunohistoquímica de adiponectina**

Los portaobjetos de células se incubaron durante 40 minutos en tampón de citrato sódico (pH 6.0) en un baño de agua a 95-99 °C y se dejaron enfriar 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incubaron toda la noche a 4 °C con un anticuerpo anti-adiponectina de cabra (ACRP-30 N-20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluido en una solución para dilución de anticuerpos Dako ChemMate (1:200) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Al día siguiente, se incubaron 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% (Merck, Darmstadt, Alemania) para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Las siguientes incubaciones fueron de 30 minutos con un anticuerpo multiunión anti-ratón, conejo y cabra IgG biotilado (Dako LSAB<sup>®</sup> System HRP, Dako, Carpinteria, CA, USA), de 30 minutos con peroxidasa conjugada con estreptavidina (Dako LSAB<sup>®</sup> System HRP), y de 10 minutos en 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorhidro (Dako Liquid DAB + Substrate-chromogen system). Entre estas incubaciones, las secciones se lavaron 2 veces durante 5 minutos con TBS (0.05 M Tris pH 7.6 conteniendo 0.3 M NaCl), y tras la última incubación con DAB se lavaron con agua destilada. Por último los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina Harris durante 1 minuto.

### **2.7.2. Inmunohistoquímica de receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2**

Los portaobjetos se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-AdipoR1 de conejo (41-65) (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA) a una dilución

1:100, y toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-AdipoR2 de conejo (4-39) (Phoenix Pharmaceuticals) a una dilución 1:50. Posteriormente se incubaron 10 minutos con peróxido de hidrógeno al 3%, por 30 minutos con un anticuerpo anti-conejo y ratón HRP conjugado Envision<sup>®</sup> (DAKO), y durante 10 minutos en 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorhidro (Dako Liquid DAB + Substrate-chromogen system). Entre las incubaciones, las secciones se lavaron 2 veces durante 5 minutos con TBS, y tras la última incubación con DAB se lavaron con agua destilada y se contrastaron con hematoxilina.

### **2.7.3. Doble inmunofluorescencia**

Esta técnica se utilizó sobre el cultivo de cardiomiocitos atriales humanos para confirmar la identidad de las células en cultivo. Para ello se utilizó un anticuerpo monoclonal para la cadena pesada de la miosina (MHC) cardíaca (3-48. Abcam, Cambridge, UK), que permite identificar a las células cardíacas; además de los anticuerpos mencionados anteriormente para adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2.

Los portos se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo anti-adiponectina de cabra (1:200), 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-AdipoR1 de conejo (1:100), o toda la noche con el anticuerpo anti-AdipoR2 de conejo (1:50). A continuación, se incubaron 1 hora con el anticuerpo Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-cabra IgG de conejo (1:200), para la detección de adiponectina, o con el anticuerpo Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-conejo IgG de cabra (1:200), para la detección de los receptores. Las siguientes incubaciones realizadas fueron de 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-MHC cardíaca (1:1000) (Abcam, Cambridge, UK), y de 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo Cy3-conjugado fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-ratón IgG de oveja (1:100).

Los controles negativos de las distintas inmunohistoquímicas se realizaron mediante preadsorción del anticuerpo anti-adiponectina con adiponectina recombinante 10 nmol/ml, tanto humana como de ratón (BioCat GmbH, Heidelberg, Alemania), y con su péptido de bloqueo (sc-17044; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a una concentración 10 nmol/ml. También se hicieron reemplazando los anticuerpos de cabra y conejo, que detectan los diferentes receptores de adiponectina, por concentraciones equivalentes de suero normal de

cabra y conejo. Otro tipo de controles negativos se realizó omitiendo pasos esenciales de las reacciones.

Para la visualización y fotografía de las secciones se utilizó un microscopio Provis AX70 (Olympus Corp., Tokyo, Japón).

### **2.8. Tinción Vital Hoechst**

Para este ensayo,  $10^4$  cardiomiocitos neonatales de rata se sembraron sobre placas de 24 pocillos y se mantuvieron durante 48 horas deprivadas de suero en medio DMEM, en presencia o ausencia de  $10 \mu\text{g/ml}$  de adiponectina recombinante de rata (BioCat GmbH, Heidelberg, Alemania). Finalizados los tiempos de tratamiento las células se incubaron con la solución Hoechst tal como se indicó en el apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento.

### **2.9. Ensayo de viabilidad MTT**

Este ensayo trató de determinar si la administración de adiponectina ejerce algún efecto sobre la proliferación de la línea celular de cardiomiocitos HL-1. El tratamiento celular consistió en una dosis-respuesta a concentraciones crecientes de adiponectina. Tras 12 horas de serodeprivación en medio ExCell A+B, las células se trataron durante 24 horas con dosis  $0.1 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $5 \mu\text{g/ml}$  y  $10 \mu\text{g/ml}$ .

Ver apartado Material y Métodos Hormona de Crecimiento.

### **2.10. Radioinmunoensayo de adiponectina**

Los niveles de adiponectina en los medios de cultivo, tanto de células HL-1 como de cardiomiocitos humanos, se determinaron utilizando un kit de radioinmunoensayo específico para la hormona (Linco Research, Inc., St. Charles, MO, USA) según las instrucciones del fabricante. Los medios de cultivo se recogieron tras 24 horas de serodeprivación de las células en ExCell A+B y DMEM, respectivamente. De esta forma se determinó la secreción basal de adiponectina por parte de los cardiomiocitos al medio de cultivo.

A continuación se muestra el diseño experimental del ensayo:

	Tampón de ensayo		Adiponectina [I-125]	Anticuerpo anti-adipo	Suero de conejo	Reactivo precipitación
<b>Cuentas totales (TC)</b>			100µl			
<b>Unión no específica (NSB)</b>	300µl		100µl		10µl	1ml
<b>Referencia (Bo)</b>	200µl		100µl	100µl	10µl	1ml
<b>Estándares</b>	100µl	100µl	100µl	100µl	10µl	1ml
<b>Controles</b>	100µl	100µl	100µl	100µl	10µl	1ml
<b>Muestras (medio de cultivo)</b>	100µl	100µl	100µl	100µl	10µl	1ml

Todos los reactivos que vienen incluidos en el kit se manipularon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los puntos incluidos en el ensayo se realizaron por duplicado. La recta se construyó a partir de los estándares incluidos en el kit, con concentraciones de adiponectina crecientes que van desde 0.78 ng/ml hasta 200 ng/ml. Este kit incluye dos controles internos que garantizan la eficiencia del ensayo.

Desarrollo del ensayo:

Primer día: Se pipetearon 300 µl de tampón de ensayo a los tubos NSB, 200 µl a los Bo, y 100 µl al resto de los tubos del ensayo, excepto a los TC. A continuación se añadieron 100 µl de los estándares, controles, y muestras a los tubos correspondientes. Seguidamente se añadieron 100 µl de <sup>125</sup>I-Adiponectina a todos los tubos, y 100 µl de anticuerpo anti-adiponectina a todos los tubos excepto los TC y NSB. La mezcla se agitó, y se dejó cubierta durante toda la noche a temperatura ambiente.

Segundo día: Se añadieron 10 µl de suero normal de conejo a todos los tubos excepto los TC. Posteriormente, 1ml de reactivo de precipitación frío (4 °C) se añadió a todos los tubos excepto a los TC. Se agitó la mezcla y se incubó durante 20 minutos a 4 °C. Por último, todos

los tubos, excepto los TC, se centrifugaron a 3000x g 40 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se desechó mediante inversión dejando el precipitado seco. La radiactividad asociada a cada tubo se cuantificó en un contador gamma.

### **2.11. Ensayos de captación de glucosa**

Esta serie de ensayos se realizó con el fin de determinar si la adiponectina es capaz de estimular la captación de glucosa en cardiomiocitos, tanto en la línea celular HL-1 como sobre el cultivo primario de cardiomiocitos de rata.

Cardiomiocitos HL-1 y neonatales de rata se sembraron a una densidad de  $9 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 24. Cada uno de los puntos del ensayo se sembró por duplicado. Una vez pegadas, las células se lavaron y se privaron de suero durante 16 horas en los medios correspondientes, excepto en los ensayos con el inhibidor de AMPK, donde la privación fue solamente de 30 minutos. Transcurrida la privación, los tratamientos se administraron como se describe a continuación.

#### **2.11.1. Línea celular HL-1**

Tras 16 horas de serodeprivación en medio ExCell A+B las células fueron tratadas con 10 µg/ml adiponectina recombinante de ratón durante 24 horas. Esta incubación se hizo en presencia o ausencia de insulina 100 nM que fue administrada durante la última hora de incubación. La insulina se utilizó como control positivo del experimento.

Asimismo, un estudio tiempo-respuesta fue realizado sobre estas células. Transcurrida la privación, las células se trataron con adiponectina 10 µg/ml durante tiempos de 5 minutos, 30 minutos y 2 horas. También se utilizó insulina como control positivo. Para intentar obtener una mayor respuesta celular, el tratamiento de insulina se realizó a una dosis 300 nM durante 20 minutos.

Un tercer grupo de experimentos realizado con la línea celular, incorporó a los tratamientos un inhibidor específico de la AMPK, 9-β-D-arabinofuranosido (araA) (MP Biochemicals Germany GmbH, Eschwege, Germany) (Wu X et al. 2003). En esta serie de

experimentos se modificó el protocolo del ensayo con el fin de obtener una respuesta mayor. Las células se lavaron y privaron de suero durante 30 minutos en HBS. Transcurrido este tiempo se realizó un pretratamiento de 20 minutos con araA 2 mM. A continuación se administró la adiponectina 10 µg/ml, con la que se incubó durante 2 horas.

### **2.11.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata**

Tras 16 horas de serodeprivación en medio DMEM bajo en glucosa, las células se trataron con 10µg/ml adiponectina recombinante de rata durante 24 horas. Esta incubación se hizo en presencia o ausencia de insulina 100 nM que fue administrada durante la última hora del tratamiento. La insulina se utilizó como control positivo del experimento.

Cumplidos los tiempos de tratamiento, las células se lavaron dos veces en 500µl de tampón salino HEPES (HBS; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, pH 7.4). A continuación, se incubó cada pocillo en 250 µl de la solución HBS conteniendo 10 µM 2-deoxi-D-glucosa y 1 µCi/µl 2-deoxi-D-[<sup>3</sup>H]glucosa (16 µCi/mmol) (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces en 500 µl de una solución salina fría de NaCl al 0.9% (p/v), y se lisaron en 500 µl de NaOH 0.05 N. Para favorecer la lisis, el volumen se hizo pasar varias veces por la punta de la pipeta. Del volumen final de lisado se recogieron 50 µl a partir de los cuales se haría posteriormente la cuantificación de proteína. El resto del lisado se transfirió a tubos específicos de contador beta, se mezcló con dos volúmenes de líquido de centelleo, y se cuantificó la radiactividad en un contador beta.

La captación no específica se determinó en presencia de citocalasina B (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Para ello, y a mayores de los puntos del experimento, se sembraron dos pocillos sin tratamiento los cuales se incubaron durante 30 minutos con la solución conteniendo la glucosa marcada y una dosis 10 µM de citocalasina B. De esta forma se determinó que cantidad de radiactividad incorporada se debe a una entrada inespecífica de glucosa en la célula, ya que la citocalasina B inhibe el transporte de glucosa interfiriendo con la polimerización de los filamentos de actina intracelulares, evitando así el transporte activo de

glucosa. Los valores obtenidos de este punto se restaron al resto del ensayo.

Cuantificación de proteína: se realizó a partir de la construcción de una recta patrón con albúmina de suero bovina (BSA). Se utilizaron concentraciones crecientes de BSA 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml y 1 mg/ml. Se pipetearon 10  $\mu$ l tanto de las muestras como de los puntos de la recta en tubos limpios. Se mezclaron con 50  $\mu$ l de reactivo A y 400  $\mu$ l del reactivo B. La mezcla se agitó y se dejó incubar durante 15 minutos para que la reacción colorimétrica tuviera lugar. A continuación la absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 750 nm (Beckman DU62). Por último las concentraciones de la muestras se determinaron por interpolación de las absorbancias obtenidas en la recta patrón.

Los valores de glucosa incorporada se expresaron en picomoles de glucosa por miligramo de proteína del pocillo por tiempo de incubación con la glucosa (pmol/mg/min). Por tanto fue necesario normalizar la glucosa incorporada en cada pocillo por la cantidad de proteína total presente en el mismo. El valor obtenidos e dividió por 30 que es el tiempo (en minutos) de incubación con la solución. La cuantificación de la proteína se realizó mediante el método de Lowry modificado. Para ello se utilizó el reactivo DC Protein Assay (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

## **2.12. Análisis de la secuencia de adiponectina y AdipoR1 y AdipoR2**

Para confirmar la identidad de los productos de PCR amplificados como adiponectina y sus receptores, éstos se secuenciaron utilizando el kit BIGDye<sup>TM</sup> Terminador (Amersham Biosciences). El análisis de la secuencia se hizo para el ADNc de adiponectina amplificado a partir del ARNm obtenido de células HL-1 y cardiomiocitos humanos. En el caso de los receptores, solamente se analizó la secuencia de los ADNc obtenidos a partir de células HL-1.

Partimos de los productos de PCR a los cuales se les realizó una electroforesis en gel de agarosa para determinar la presencia de una sola banda. La electroforesis se hizo tanto para el ADNc de adiponectina como el de sus receptores. A continuación se realizó la purificación de los productos mediante ExoSAP-IT. Para ello se cogieron 5  $\mu$ l de ADNc que se mezclaron con 2  $\mu$ l de la enzima. Con esta mezcla se realizó la reacción de purificación mediante incubación en

un termociclador a 37 °C durante 15 minutos y a 80 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Una vez purificados los productos, se realizó la reacción de secuenciación. Se preparó una reacción para cada uno de los cebadores utilizados en la PCR. Así, para cada producto a secuenciar se hicieron dos reacciones, una con el cebador sentido y otra con el antisentido. El objetivo de esto era abarcar la longitud total del producto a secuenciar. Para ello se mezclaron 2.5 µl del producto purificado, 0.5 µl de cebador (stock 3 pmol/µl) y 2 µl de Premix (BIGDye™ Terminador Kit; Amersham Bioscience). Esta mezcla se llevó al termociclador donde las condiciones de amplificación fueron: 4 minutos a 96 °C; 30 ciclos de 15 segundos a 96 °C, 10 segundos a 50 °C, y 3 minutos a 60 °C; y 10 minutos a 60 °C.

El producto obtenido se precipitó con etanol y acetato sódico de la siguiente manera: por cada tubo reacción se preparó una mezcla conteniendo 31.25 µl de etanol absoluto (-20 °C), 1.5 µl de acetato sódico 3 M pH 4.6, y 7.25 µl de agua. Se añadieron 40 µl de la mezcla a cada tubo de reacción, se resuspendió arriba-abajo y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm 15 minutos a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Se añadieron 90 µl de etanol al 70% (-20 °C) y se centrifugó esta vez a 14000 rpm 6 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se secó durante 30 minutos a 47 °C en un termociclador dejando la tapadera abierta. Una vez seco el precipitado se resuspendió en 10 µl de formamida y se cargó la muestra en el secuenciador. El secuenciador utilizado fue un 3100 Avant Genetic Analyzer ABI PRISM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### **2.13. Determinación de nitritos: Ensayo colorimétrico de Griess**

Este ensayo se realizó para determinar una posible inducción de la producción de óxido nítrico por adiponectina sobre el cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Para llevar a cabo este ensayo, se utilizaron los medios de cultivo obtenidos de los tratamientos descritos en el apartado de Western Blot (estudio dosis-respuesta de adiponectina mas aminoguanidina, y estudio tiempo-respuesta).

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos, a una densidad de  $9 \times 10^4$  células por

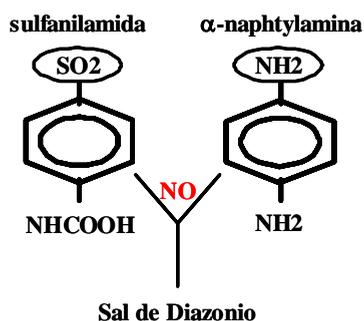
pocillo. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se recogió el medio de cultivo de los pocillos y se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos a 4 °C con el fin de eliminar posibles restos celulares. A continuación se procedió a la determinación de la presencia de óxido nítrico en los mismos. El ensayo de Griess permite determinar los niveles de óxido nítrico de forma indirecta, a través de una reacción colorimétrica desarrollada en presencia de óxido nítrico.

La concentración de nitritos presente en el medio se determinó a partir de una recta patrón realizada con  $\text{NaNO}_2$ . Los valores de la recta utilizados fueron 0.0625  $\mu\text{g/ml}$ , 0.125  $\mu\text{g/ml}$ , 0.250  $\mu\text{g/ml}$ , 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 0.750  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  y 4  $\mu\text{g/ml}$ .

En el ensayo se utilizaron dos reactivos: Sulfamilamida 1% en ácido fosfórico al 5% en agua (P/V) y  $\alpha$ -Naphthylamina al 0.1% en agua (P/V), que se mezclaron en una relación 1:1. Este reactivo a su vez, se mezcló a volúmenes iguales (50  $\mu\text{l}$ ) con el medio de cultivo, de forma que tras una incubación de 10 minutos, en la que se desarrolló la reacción colorimétrica, las muestras se leyeron a 550 nm en un lector de ELISA.

Los valores de absorbancia obtenidos para las muestras se interpolaron en la recta patrón de forma que se determinaron las concentraciones existentes en los medios de cultivo.

El principio del ensayo es el siguiente: la mezcla de sulfamilamida con  $\alpha$ -naphthylamina en presencia de óxido nítrico, produce una reacción de forma que se genera la sal de diazonio, la cual, según a la concentración que se encuentre, va a colorear en mayor o menor medida el medio de reacción.



#### **2.14. Ensayo de captación de ácidos grasos: BODIPY**

El ensayo mediante BODIPY (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA), permitió analizar la capacidad que presentan las células de incorporar o captar ácidos grasos de cadena larga al citoplasma. El ensayo se basa en la incubación de las células en presencia de un ácido graso de cadena larga marcado con fluorescencia 4,4-difluoro-5-metil-4-bora-3a, 4a-diazida-s-indacene-3-ácido dodecanoico (BODIPY<sup>®</sup> 500/510 C<sub>1</sub>, C<sub>12</sub>; D-3823 Bodipy-FITC) y posterior análisis de la fluorescencia incorporada a las células mediante citometría de flujo.

Para ello se sembraron  $4 \times 10^5$  células HL-1 por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. Una vez estabilizadas y a la confluencia deseada, la células se privaron de suero durante 12 horas en medio ExCell A+B, y se realizó el tratamiento durante 30 minutos, 2 horas, 6 horas y 12 horas con adiponectina 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Tras los tratamientos se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron 2 veces y se incubaron en PBS conteniendo 10  $\mu\text{M}$  Bodipy-FITC y 20  $\mu\text{M}$  de BSA libre de ácidos grasos durante 30 segundos. Tras la reacción con el lípido, las células se lavaron 3 veces con PBS + 0.1% BSA libre de ácidos grasos (250  $\mu\text{l}$ ), eliminando así el exceso de Bodipy-FITC. Las células se despegaron de los pocillos con tripsina EDTA, que se inactivó con 1 ml de PBS frío (4 °C). A continuación se centrifugaron a 1500 rpm 5 minutos a 4 °C.

El precipitado se resuspendió en 1ml de PBS frío, y se transfirió a tubos de citometría donde se incubó durante 15 minutos con yoduro de propidio (1  $\mu\text{M}$ ) en oscuridad. El marcaje con yoduro de propidio nos permitió determinar el porcentaje de células muertas durante el procesamiento.

La fluorescencia incorporada a las células se analizó mediante citometría de flujo en un FACSCALIBUR (Becton & Dickinson, San José, CA, USA), utilizando el programa Cell Quest. Los valores obtenidos se corresponden con la media de la intensidad de fluorescencia.

### **3. Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos en este trabajo se expresaron como medias  $\pm$  desviaciones estándar media (SEM).

Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante ANOVA

seguido de un test de comparaciones múltiples. Un valor de P menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ) se consideró significativo.

ARNm		Secuencia	Producto (pb)
Adiponectina ratón (Viengchareun S et al. 2002)	Sentido	5'-GACGTTACTACAACCTGAAGAGC-3'	532
	Antisentido	5'-CATTCTTTTCCTGATACTGGTC-3'	
Adipo-R1 ratón (Yamauchi T et al. 2003)	Sentido	5'-ACGTTGGAGAGTCATCCCGTAT-3'	132
	Antisentido	5'-CTCTGTGTGGATGCGGAAGAT-3'	
Adipo-R2 ratón (Yamauchi T et al. 2003)	Sentido	5'-TCCCAGGAAGATGAAGGGTTTAT-3'	72
	Antisentido	5'-TTCCATTCGTTTCGATAGCATGA-3'	
Adiponectina humana (Liu YM et al. 2003)	Sentido	5'-TGGTGAGAAGGGTGAGAA-3'	221
	Antisentido	5'-AGATCTTGGTAAAGCGAATG-3'	
Adipo-R1 humano (Yamauchi T et al. 2003)	Sentido	5'-TTCTTCCTCATGGCTGTGATGT-3'	70
	Antisentido	5'-AAGAAGCGCTCAGGAATTCG-3'	
Adipo-R2 humano (Yamauchi T et al. 2003)	Sentido	5'-ATAGGGCAGATAGGCTGGTTGA-3'	75
	Antisentido	5'-GGATCCGGGCAGCATACA-3'	
Adiponectina rata (Altomonte J et al. 2003)	Sentido	5'-ACCCAGGAGATGCTG-3'	405
	Antisentido	5'-ACCTGGAGCCAGACTTGGTC-3'	
Adipo-R1 rata (Winzell MS et al. 2004)	Sentido	5'-CTTCTACTGCTCCCCACAGC-3'	138
	Antisentido	5'-TCCCAGGAACACTCCTGCTC-3'	
Adipo-R2 rata (Winzell MS et al. 2004)	Sentido	5'-CCACACAACACAAGAATCCG-3'	117
	Antisentido	5'-CCCTTCTTCTGGGAGAATGG-3'	
GAPDH	Sentido	5'-TCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG-3'	376
	Antisentido	5'-GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC-3'	

**Tabla 1: Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR, y tamaños de amplificación de los productos obtenidos.**

<b>Producto</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Extensión</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Extensión final</b>
Adiponectina ratón	95°/45seg	56°/45seg	72°/45seg	35	72°/10min
Adipo-R1 ratón	95°/15seg	60°/1min	72°/1min	35	72°/10min
Adipo-R2 ratón	95°/15seg	60°/1min	72°/1min	35	72°/10min
Adiponectina humana	95°/30seg	56°/45seg	72°/45seg	35	72°/10min
Adipo-R1 humano	95°/15seg	62°/1min	72°/1min	35	72°/10min
Adipo-R2 humano	95°/15seg	62°/1min	72°/1min	35	72°/10min
Adiponectina rata	95°/30seg	55°/1min	72°/1min	35	72°/10min
Adipo-R1 rata	95°/15seg	60°/1min	72°/1min	35	72°/10min
Adipo-R2 rata	95°/15seg	60°/1min	72°/1min	35	72°/10min

**Tabla 2: Condiciones de PCR utilizadas para cada pareja de cebadores.**



## **RESULTADOS ADIPONECTINA**



## **1. Expresión de los genes de adiponectina y receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) por cardiomiocitos**

La posible expresión del gen de adiponectina se analizó mediante RT-PCR, a partir de ARNm de la línea celular HL-1, de cultivo primario de cardiomiocitos humanos atriales y de cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata.

En cuanto a la línea de cardiomiocitos HL-1, los resultados obtenidos mostraron la expresión del ARNm correspondiente al gen de adiponectina en dicha línea celular. La longitud del ADNc amplificado se correspondió con la del producto obtenido a partir de la amplificación del ARNm de tejido adiposo de ratón, utilizado como control positivo de expresión (532 pb) (Figura 1A). Asimismo, la expresión de este gen también se observó en cardiomiocitos humanos atriales, resultando en la amplificación de una banda de ADNc igual a la obtenida a partir del ARNm de miocardio total y grasa humanos (221 pb) (Figura 1B). En cardiomiocitos neonatales de rata, no se detectó el ARNm de adiponectina, sin embargo, sí aparece en corazón de rata adulta. En este caso, la identidad del producto amplificado se correspondió con la del producto obtenido a partir de tejido adiposo de rata (405 pb) (Figura 1C). Estos resultados estarían sugiriendo que adiponectina se expresa en cardiomiocitos de rata en períodos posteriores a las 24-48 horas del nacimiento.

Una vez determinada la expresión génica de adiponectina, el estudio se centró en comprobar la expresión de los genes de los receptores de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2, en los mismos modelos celulares. Los resultados obtenidos mediante RT-PCR mostraron la expresión génica de ambos receptores por parte de la línea celular HL-1 (132 pb y 72 pb, respectivamente). Los controles positivos utilizados fueron miocardio de ratón para AdipoR1 e hígado de ratón para AdipoR2 (Figura 2A). Se comprobó también como cardiomiocitos atriales humanos aislados expresaban el ARNm correspondiente a los genes de ambos receptores (70 pb y 75 pb, respectivamente). En este caso los controles de expresión utilizados fueron músculo esquelético humano, para AdipoR1, e hígado humano, para AdipoR2 (Figura 2B). Cuando se analizó la expresión de los receptores a partir de ARNm de cardiomiocitos neonatales de rata de 24-48 horas de edad, se observó la expresión génica de AdipoR1 (138 pb), pero no así la de

AdipoR2 (117 pb). Los controles positivos utilizados fueron músculo esquelético e hígado de rata adulta (Figura 2C). A continuación se llevó a cabo el análisis de la expresión de AdipoR2 en corazones totales de 24-48 horas edad. En este caso, y como cabía esperar, tampoco se observó la presencia del ARNm de dicho receptor. Un dato interesante es que esto mismo ocurría al estudiar la expresión en el hígado extraído de estos mismos neonatos, tejido considerado el de mayor expresión para este receptor. Se extrajeron posteriormente corazón e hígado de ratas macho y hembra de 6, 9 y 25 días de edad, y mediante RT-PCR se vio que la expresión de AdipoR2 aparecía de forma evidente en tejidos de 25 días de edad, independientemente del sexo del animal (Figura 3A machos y 3B hembras). Solo en hígado se pudo observar la expresión de AdipoR2 a partir del día 21.

Para confirmar la veracidad de los resultados se incluyeron en las reacciones de amplificación los controles negativos de la retrotranscripción. Además, se amplificó el gen GAPDH como control de la eficiencia de la reacción.

La identidad de los productos obtenidos en las reacciones de PCR correspondientes a adiponectina de cardiomiocitos HL-1 y humanos, así como de los receptores AdipoR1 y AdipoR2 de células HL-1, se confirmó mediante secuenciación de los ADNc. Las secuencias obtenidas para todos los productos se correspondieron con las publicadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA).

## **2. Síntesis de adiponectina y receptores de adiponectina por cardiomiocitos**

Una vez determinada la expresión a nivel génico de adiponectina y sus dos receptores, se pasó a analizar la posible síntesis proteica de dichas moléculas por cardiomiocitos. Para ello se utilizó la inmunocitoquímica en cardiomiocitos con anticuerpos específicos para adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2. Este análisis se realizó en células de ratón HL-1 y en cultivo primario de cardiomiocitos atriales humanos, así como en tejidos utilizados como control positivo.

Los resultados obtenidos en células HL-1 mostraron una intensa inmunorreactividad en el citoplasma de dichas células, tanto para el anticuerpo anti-adiponectina, como para anti-AdipoR1 y anti-AdipoR2 (Figura 4), lo que demuestra la síntesis proteica de adiponectina y sus

receptores en una línea pura de cardiomiocitos. La preadsorción del anticuerpo primario anti-adiponectina con 10 nmol/ml de adiponectina recombinante de ratón tuvo resultados negativos (Figura 4). El análisis del tejido miocárdico de rata y ratón mostró también inmunorreactividad para adiponectina. El tejido utilizado como control positivo de expresión de adiponectina fue el tejido adiposo. En el caso de los receptores de adiponectina se utilizó como controles positivos músculo esquelético para AdipoR1 e hígado para AdipoR2 (Figura 4).

Para el estudio desarrollado en cardiomiocitos humanos se utilizó la técnica de inmunocitoquímica con doble fluorescencia. La razón de utilizar esta técnica fue poder diferenciar el origen de la inmunorreactividad. Al tratarse de un cultivo primario es posible la contaminación con otros tipos celulares, en particular con fibroblastos. El hecho de utilizar un anticuerpo contra una proteína específica de cardiomiocitos, como la cadena pesada de la miosina cardíaca, garantiza el poder diferenciarlos de los fibroblastos y otras células contaminantes. Los resultados mostraron positividad citoplasmática para adiponectina y sus receptores en cardiomiocitos humanos. Esta positividad colocalizó sobre las mismas células que se marcaron con el anticuerpo anti-MHC, lo que garantizaba que eran cardiomiocitos (Figura 5). La preadsorción del anticuerpo primario anti-adiponectina con 10 nmol/ml de adiponectina recombinante humana prevenía la reacción positiva (Figura 5).

### **3. Secreción de adiponectina por cardiomiocitos HL-1 y cardiomiocitos humanos en cultivo primario**

Tras la demostración de la expresión génica y síntesis proteica de adiponectina por cardiomiocitos, se pasó a determinar si estas células eran capaces de secretar la hormona al medio de cultivo.

La técnica de radioinmunoensayo permitió cuantificar las concentraciones de adiponectina presentes en el medio de cultivo de ambos modelos celulares tras el mantenimiento de éstas durante 24 horas en medio de deprivación. La concentración observada para células HL-1 fue de  $2.7 \pm 0.6$  ng/ml ( $n = 5$ ), y de  $3.1 \pm 0.2$  ng/ml ( $n = 10$ ) para cardiomiocitos atriales humanos. De esta forma se demostraría que además de sintetizar la proteína, los cardiomiocitos son capaces de secretarla al medio de cultivo.

Recientemente se ha publicado un trabajo donde se muestra que la concentración de adiponectina secretada al medio de cultivo por 100 mg de tejido adiposo cultivado *in vitro* sería alrededor de 38 ng/ml (Hoffstedt J et al. 2004). Teniendo en cuenta que el número de células presentes en 100 mg de tejido adiposo es mayor que el presente en nuestros cultivos (células HL-1 en confluencia: 80000; cardiomiocitos humanos extraídos de orejuela: 30000), y que el tejido adiposo es la principal fuente de adiponectina, se puede decir que los niveles de adiponectina secretados por los cardiomiocitos en cultivo estarían dentro del mismo rango que los secretados por adipocitos en cultivo.

#### **4. Efecto de adiponectina sobre la captación de glucosa por cardiomiocitos**

Dado que la adiponectina es una hormona con propiedades sensibilizadoras a insulina, se decidió estudiar el papel de ésta sobre la captación de glucosa por parte de los cardiomiocitos. Estos ensayos fueron realizados tanto en células HL-1 como en cardiomiocitos neonatales de rata.

##### **4.1. Línea celular HL-1**

En una primera serie de experimentos se realizó un estudio tiempo-respuesta. Para ello, las células se estimularon durante 5, 30 y 120 minutos con 10 µg/ml de adiponectina. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en la captación de 2-deoxi-D-<sup>3</sup>H] glucosa del 4.5±1.6% (no significativo, n= 4) a los 5 minutos, del 12.9±2.6% ( $p < 0.01$ , n= 4) tras 30 minutos, y del 18.5±2.8% ( $p < 0.01$ , n= 4) tras 120 minutos de estimulación. El tratamiento con insulina 300 nM durante 20 minutos, utilizado como control positivo, mostró un incremento en la captación de glucosa del 47.5±7.6% ( $p < 0.001$ , n= 4) (Figura 6A).

Posteriormente se realizaron una serie de tratamientos con adiponectina durante 24 horas a una dosis de 10 µg/ml. Los resultados mostraron que adiponectina incrementaba la captación de 2-deoxi-D-<sup>3</sup>H] glucosa en un 27.02±5.5% ( $p < 0.05$ , n= 8). El tratamiento con insulina 100 nM durante 60 minutos aumentó la captación en un 48.7±10.4% ( $p < 0.001$ , n= 8), mientras que la estimulación conjunta de adiponectina mas insulina lo hizo en un 70.5±10.6% ( $p < 0.001$ , n= 8) (Figura 6B).

#### 4.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata

Se analizó la captación de 2-deoxi-D-[ $^3\text{H}$ ] glucosa tras estimulaciones durante 24 horas con adiponectina recombinante de rata (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados obtenidos mostraron que la adiponectina inducía un incremento en la captación de glucosa del  $49.6\pm 10.4\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ). La estimulación con insulina 100 nM durante 60 minutos aumentó la captación de glucosa en un  $90.1\pm 19.9\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ), mientras que la coestimulación de adiponectina con insulina lo hizo en un  $138.2\pm 20.2\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ) (Figura 6C).

Estos resultados indican que la adiponectina es capaz de incrementar la captación de glucosa tanto basal como estimulada por insulina en cardiomiocitos.

#### 5. Papel de la AMPK en el efecto de adiponectina

Se estudió un posible efecto de la adiponectina a través de la vía de la quinasa dependiente de AMP (AMPK), involucrada en procesos metabólicos como la captación de glucosa. La utilización de la técnica de Western Blot permitió estudiar si adiponectina era capaz o no de activar esta molécula en cardiomiocitos HL-1.

Los resultados obtenidos mostraron como la presencia de 10  $\mu\text{g/ml}$  de adiponectina durante 5 minutos en el medio de cultivo fue capaz de inducir la fosforilación de AMPK, aumentando la misma en un  $72.0\pm 17.3\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) respecto al control no tratado. Cuando el estímulo se prolongó durante 30 minutos, nuevamente se comprobó un incremento en la fosforilación, respecto al control, de  $53.0\pm 6.3\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ). Asimismo, un tratamiento con adiponectina durante 120 minutos resultó en un incremento en la fosforilación de  $117.0\pm 11.0\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ) (Figura 7A y B).

Los resultados obtenidos sobre el efecto de adiponectina en la captación de glucosa celular, así como los datos sobre la activación de AMPK mostraron una correlación temporal. Este resultado en parte validaría la hipótesis de que el efecto de adiponectina sobre la captación de glucosa estaría mediado por la activación de la quinasa dependiente de AMP.

#### 6. Efecto de la inhibición de AMPK sobre la captación de glucosa

Con el fin de determinar si el aumento en la captación de glucosa en células HL-1 estaba mediado por la vía de AMPK, se utilizó un inhibidor farmacológico específico de ésta,

araA. Para las estimulaciones con adiponectina se escogieron tratamientos de 2 horas, ya que anteriormente se había mostrado que a este tiempo el efecto sobre la captación de glucosa era significativo (Figura 6A).

El pretratamiento de las células con araA 20 minutos antes de la estimulación con adiponectina fue capaz de inhibir la captación de glucosa inducida por adiponectina en cardiomiocitos (Figura 6D). Los resultados mostraron una disminución del  $72.1 \pm 5.3\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ) sobre la captación estimulada por adiponectina. Este dato pone de manifiesto que el efecto estimulador de adiponectina sobre la captación de glucosa en cardiomiocitos está mediado por AMPK.

### **7. Efecto de adiponectina sobre la captación de ácidos grasos por cardiomiocitos**

La disminución de estados de resistencia a insulina mediada por adiponectina, se relaciona con una disminución de los niveles plasmáticos de ácidos grasos y acumulación de triglicéridos en músculo e hígado. Por este motivo se trató de estudiar un posible efecto de la adiponectina sobre la captación de ácidos grasos en cardiomiocitos. El modelo celular utilizado fue la línea de cardiomiocitos HL-1.

Se observó que el tratamiento con  $10 \mu\text{g/ml}$  de adiponectina incrementaba la captación de ácidos grasos por parte de cardiomiocitos de una forma tiempo dependiente (Figura 8). La estimulación se comprobó ya desde tiempos cortos, siendo el pico de mayor efecto observado a los 30 minutos de tratamiento con la hormona, con una intensidad de  $975.2 \pm 37.1$  (media de la intensidad de fluorescencia) frente al control  $779.8 \pm 23.5$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ). El efecto se mantuvo con tratamientos de 2 horas ( $940.7 \pm 47.46$  vs.  $779.8 \pm 23.5$  del control;  $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ), y aunque se mostró evidente hasta las 6 horas de tratamiento ( $785.2 \pm 16.4$  vs.  $737.6 \pm 4.3$  del control;  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ), a partir de este tiempo comenzó a decrecer, desapareciendo a las 12 horas ( $767.7 \pm 39.5$  vs.  $745.4 \pm 11.3$  del control; no significativo,  $n = 3$ ).

### **8. Efecto de adiponectina sobre la viabilidad y proliferación de cardiomiocitos**

La presencia de  $10 \mu\text{g/ml}$  de adiponectina durante 48 horas en el medio de cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata, no alteró los porcentajes de apoptosis inducidos mediante serodeprivación (Figura 9A). Estos resultados, obtenidos por tinción Hoechst, estarían

demostrando que la adiponectina no presenta en este caso un efecto protector frente a la apoptosis de cardiomiocitos inducida por serodeprivación.

El análisis mediante MTT de las células HL-1, mostró que el tratamiento dosis-respuesta con adiponectina durante 24 horas, no modificó la actividad metabólica de dichas células (Figura 9B). Los valores obtenidos en unidades de absorbancia fueron, para el control  $0.390 \pm 0.047$  (no significativo,  $n=3$ ), adiponectina  $0.1 \mu\text{g/ml}$   $0.392 \pm 0.037$  (no significativo,  $n=3$ ), adiponectina  $0.5 \mu\text{g/ml}$   $0.398 \pm 0.043$  (no significativo,  $n=3$ ), adiponectina  $1 \mu\text{g/ml}$   $0.402 \pm 0.045$  (no significativo,  $n=3$ ), adiponectina  $5 \mu\text{g/ml}$   $0.390 \pm 0.044$  (no significativo,  $n=3$ ), adiponectina  $10 \mu\text{g/ml}$   $0.356 \pm 0.042$  (no significativo,  $n=3$ ). Los valores muestran que la administración de la hormona no tuvo efecto sobre la proliferación de los cardiomiocitos.

### **9. Efecto de adiponectina sobre la producción de óxido nítrico por cardiomiocitos neonatales de rata**

Se ha demostrado que la adiponectina es capaz de estimular la síntesis de óxido nítrico por células endoteliales vasculares y aórticas. Además se ha comprobado que dicho efecto esta mediado por activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial. Por tanto, se realizó un estudio con el fin de determinar si la adiponectina era capaz de inducir la síntesis de óxido nítrico por parte de cardiomiocitos.

Mediante estudios dosis y tiempo-respuesta se determinó que la dosis  $10 \mu\text{g/ml}$  de adiponectina era capaz de estimular de forma significativa la producción de óxido nítrico por parte de cardiomiocitos neonatales de rata tras 24 horas de tratamiento. Los resultados mostraron que esta dosis aumentaba en un  $138.58 \pm 26.24\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n=4$ ) las concentraciones de óxido nítrico en el medio de cultivo respecto al control (Figura 10A). Asimismo, las concentraciones de óxido nítrico determinadas en el medio de cultivo, mediante el ensayo tiempo respuesta, tras el tratamiento con  $10 \mu\text{g/ml}$  de adiponectina fueron de  $0.572 \pm 0.078 \mu\text{g/ml}$  frente a  $0.344 \pm 0.045 \mu\text{g/ml}$  del control ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ) tras 24 horas, y de  $1.364 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$  frente a  $0.852 \pm 0.051 \mu\text{g/ml}$  del control ( $p < 0.001$ ,  $n=3$ ) tras 48 horas (Figura 11A).

Los resultados de los experimentos dosis-respuesta y tiempo-respuesta demostraron que la adiponectina es capaz de estimular la producción de óxido nítrico por parte de cardiomiocitos

neonatales de rata en cultivo primario.

A continuación nos propusimos determinar qué sintasa de óxido nítrico era la responsable de dicha producción. Para ello, los experimentos de dosis-respuesta con adiponectina se completaron utilizando en ellos un inhibidor de la actividad de la sintasa de óxido nítrico inducible iNOS, la aminoguanidina. El pretratamiento con aminoguanidina 1 mM dos horas antes de la administración de adiponectina redujo las concentraciones de nitritos estimuladas por adiponectina en el medio de cultivo. Cuando la dosis de adiponectina era de 5 µg/ml la reducción por aminoguanidina fue del  $55.27 \pm 11.46\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ), y para la dosis de adiponectina de 10 µg/ml la reducción por aminoguanidina fue del  $35.41 \pm 6.0\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) (Figura 10A). Estos datos sugieren que la iNOS está participando en la producción de óxido nítrico estimulada por adiponectina en cardiomiocitos neonatales de rata.

#### **10. Acción de adiponectina sobre la sintasa de óxido nítrico inducible iNOS**

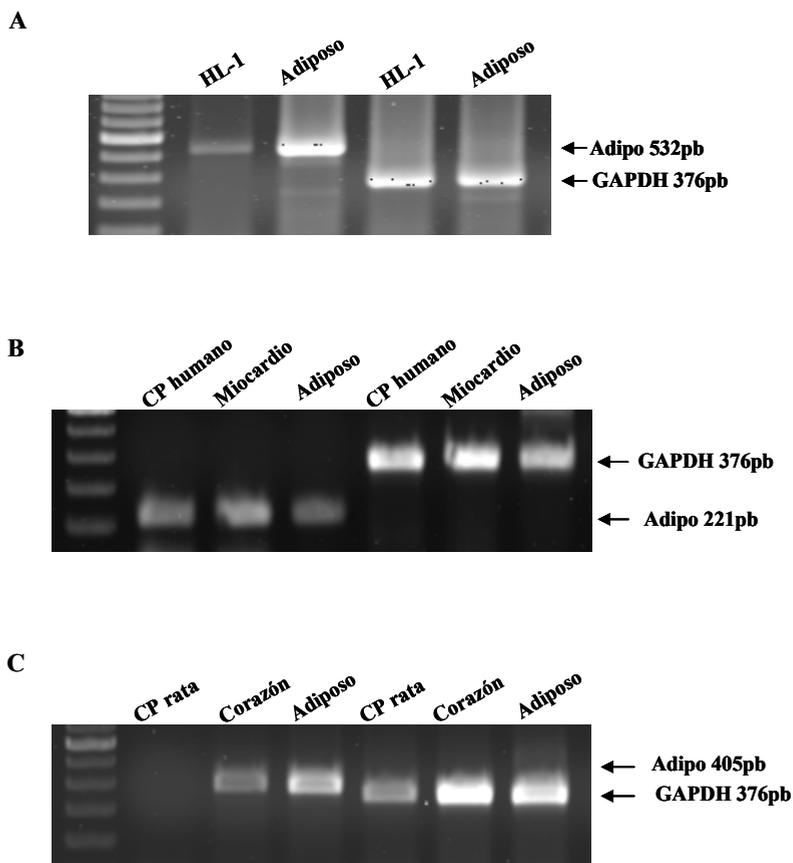
Tras comprobar que adiponectina estimula la producción de óxido nítrico en cardiomiocitos neonatales de rata, y observar que dicha acción parece estar mediada por iNOS, se analizó la acción de adiponectina sobre la expresión proteica de iNOS.

En primer lugar, se analizó mediante Western Blot el efecto de dosis crecientes de adiponectina sola (1, 5 y 10 µg/ml), y en combinación con aminoguanidina (1 mM), sobre la expresión de dicha proteína. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de iNOS se inducía por el tratamiento con adiponectina de forma dosis dependiente, siendo la expresión de la proteína evidente a las dosis de 5 y 10 µg/ml (imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes. Figura 10B). También se pudo observar que el inhibidor de iNOS no tuvo efecto sobre los niveles proteicos inducidos por adiponectina. Esto es lógico, ya que la aminoguanidina no inhibe la expresión de iNOS, sino que inhibe la capacidad de la enzima para producir óxido nítrico, ya que su estructura es similar al sustrato utilizado por la enzima para producir e ON, L-arginina (Nilsson BO. 1999).

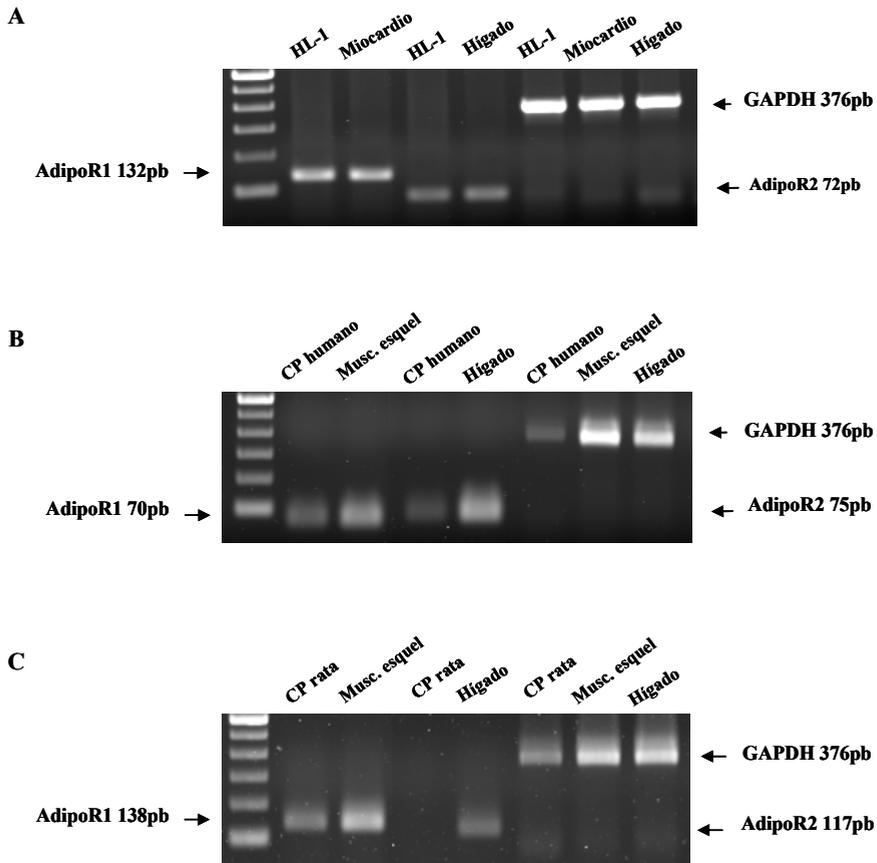
En segundo lugar, y una vez determinada la inducción de la expresión de iNOS por parte de adiponectina, se estudió el desarrollo temporal de la expresión de la proteína mediante tratamientos a distintos tiempos con adiponectina (6, 12, 24 y 48 horas). Los resultados

obtenidos mostraron que las diferencias en los niveles expresados de iNOS, respecto a controles no tratados, se hicieron visibles ya a las 6 horas de tratamiento. Estas diferencias fueron más evidentes a las 12 horas, y de forma muy clara a las 24 y 48 horas (Figura 11B).

Por tanto, y tomando en conjunto estos resultados, hemos determinado que adiponectina es capaz de inducir la producción de óxido nítrico en cardiomiocitos, y que este efecto es, al menos en parte, mediado por la sintasa de óxido nítrico inducible. Asimismo, hemos comprobado que dicho efecto es dependiente de la dosis de adiponectina administrada y del tiempo de incubación con la hormona. Estos resultados no descartan la posibilidad de que la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) esté también participando en este proceso.

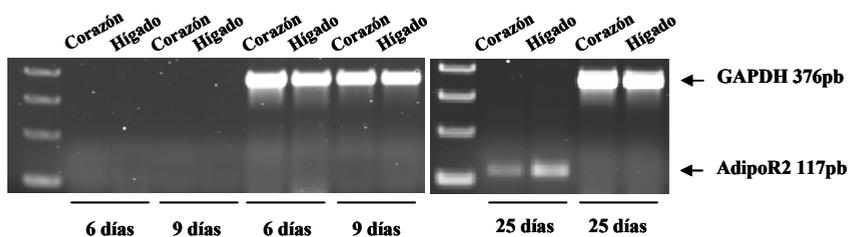


**Figura 1.** Análisis por RT-PCR de la expresión génica de adiponectina. **Panel A.** Amplificación del gen de adiponectina a partir de ARNm de células HL-1 y de tejido adiposo de ratón. **Panel B.** Amplificación del ADNc de adiponectina a partir de ARNm de cardiomiocitos humanos en cultivo primario (CP), miocardio humano, y tejido adiposo humano. **Panel C.** Amplificación del ADNc de adiponectina a partir de ARNm de corazón de rata adulta y tejido adiposo de rata. La expresión de adiponectina no se detectó a partir de ARNm de cultivo primario (CP) de cardiomiocitos neonatales de rata. El gen utilizado como control de la reacción fue gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

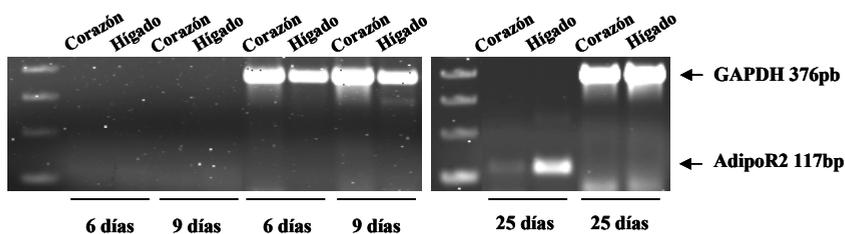


**Figura 2.** Análisis por RT-PCR de la expresión génica de los receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2). **Panel A.** Amplificación del ADNc de AdipoR1 a partir de ARNm de células HL-1 y miocardio de ratón; y de AdipoR2 a partir de ARNm de células HL-1 e hígado de ratón. **Panel B.** Amplificación del ADNc de AdipoR1 a partir de ARNm de cardiomiocitos atriales humanos en cultivo primario (CP) y músculo esquelético humano; y de AdipoR2 a partir de ARNm de cardiomiocitos atriales humanos en cultivo primario (CP) y de hígado humano. **Panel C.** Amplificación del ADNc de AdipoR1 a partir de ARNm de cultivo primario (CP) de cardiomiocitos neonatales de rata y músculo esquelético de rata. La expresión de AdipoR2 no se encontró a partir de ARNm de cardiomiocitos neonatales, pero sí de ARNm de hígado adulto. El gen utilizado como control de la reacción fue GAPDH.

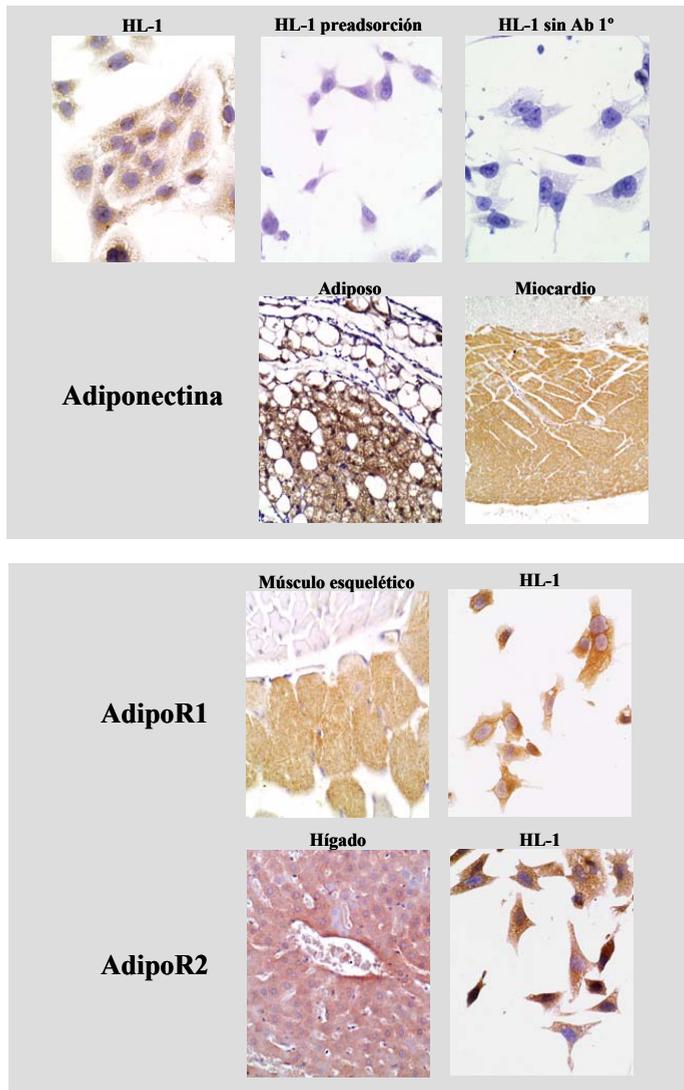
A



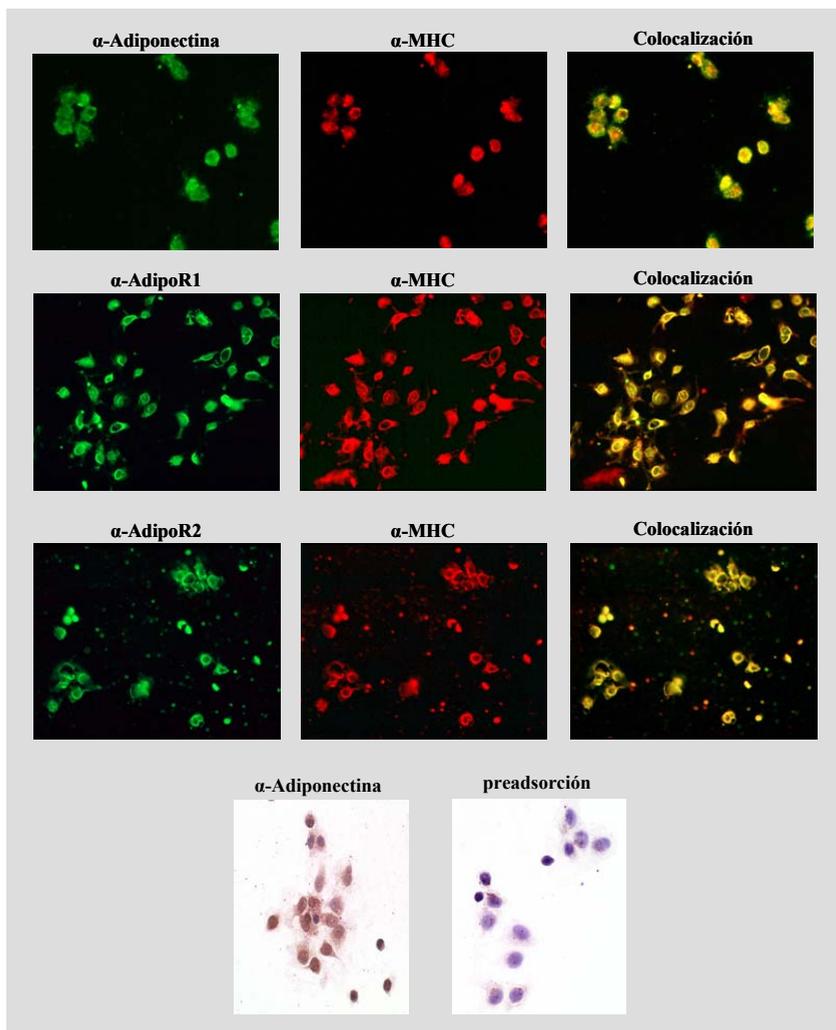
B



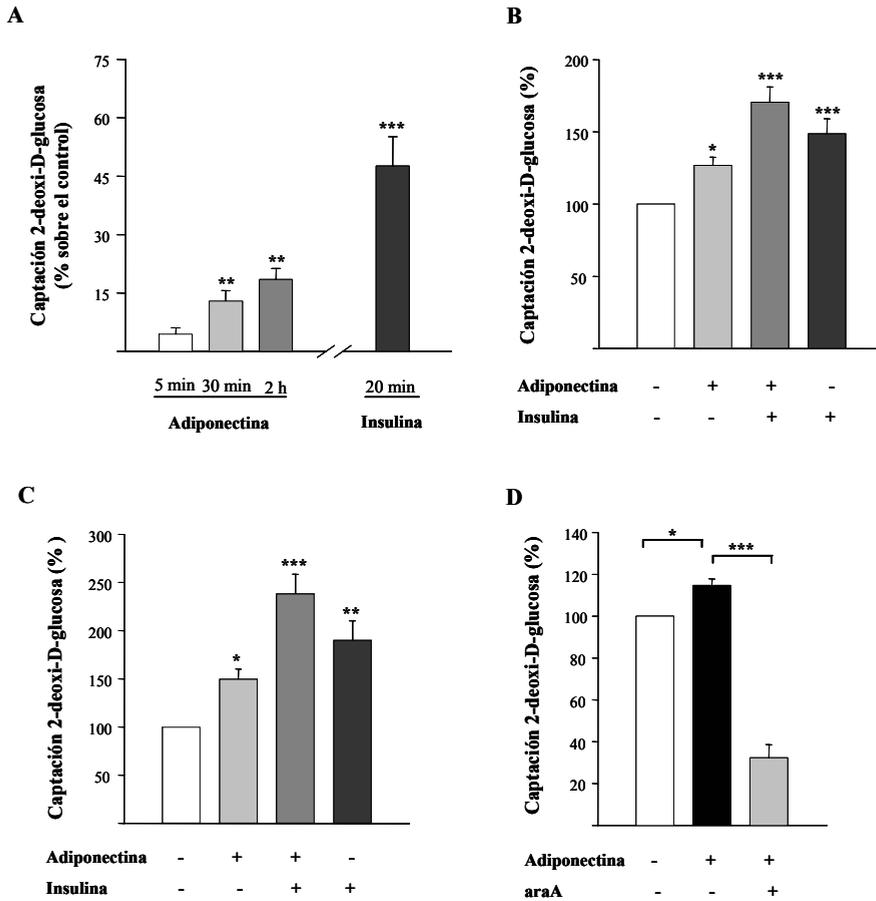
**Figura 3.** Ontogenia del receptor AdipoR2 en corazón e hígado de ratas macho y hembra. **Panel A.** Amplificación por RT-PCR del ADNc de AdipoR2 a partir de corazón e hígado de ratas macho de 6, 9 y 25 días de edad. **Panel B.** Amplificación por RT-PCR del ADNc de AdipoR2 a partir de corazón e hígado de ratas hembra de 6, 9 y 25 días de edad. En ambos casos la expresión del receptor aparece a partir del día 25 de desarrollo. El gen utilizado como control de la reacción fue GAPDH.



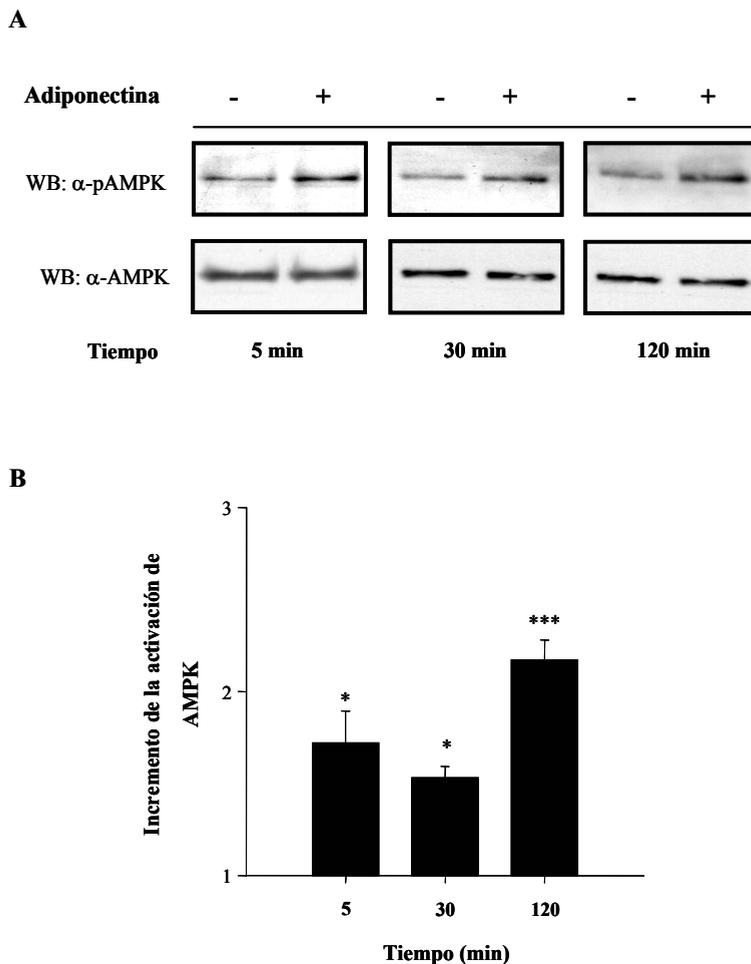
**Figura 4.** Detección por inmunohistoquímica de adiponectina y sus receptores AdipoR1 y AdipoR2. Cardiomiocitos HL-1 (40x) mostraron expresión proteica de adiponectina. Los controles negativos se realizaron mediante preadsorción del anticuerpo o utilizando suero normal de cabra en lugar del primer anticuerpo (40x). Tejido adiposo de rata (20x) y ventrículo izquierdo de rata (10x) mostraron inmunorreactividad para adiponectina. Los miocitos del músculo esquelético mostraron inmunorreactividad para AdipoR1, no así el tejido conectivo (40x). Células HL-1 mostraron positividad difusa para AdipoR1 en el citoplasma (40x). Hígado de rata mostró inmunotinción positiva para AdipoR2, al igual que cardiomiocitos HL-1.



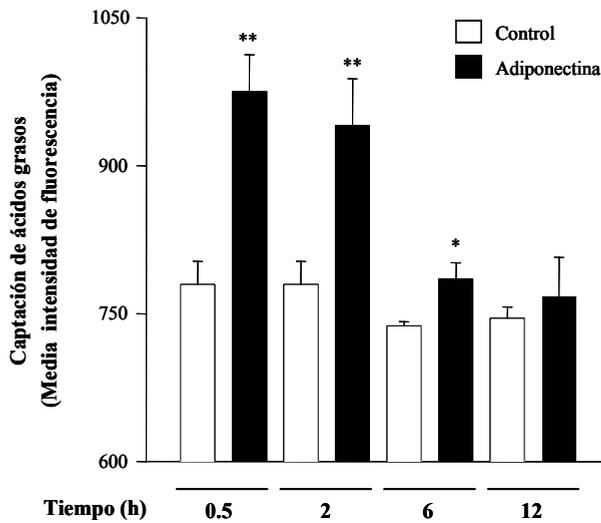
**Figura 5.** Detección por doble inmunofluorescencia de la síntesis de adiponectina y sus receptores en cardiomiocitos humanos identificados mediante inmunopositividad para la cadena pesada de la miosina cardíaca. Miocitos atriales humanos mostraron inmunofluorescencia positiva para adiponectina, cadena pesada de la miosina cardíaca, y para ambas a la vez. El mismo resultado se obtuvo sobre las células al utilizar anticuerpos contra AdipoR1 y AdipoR2. La doble tinción con adiponectina o sus receptores, y la cadena pesada de la miosina (MHC), permitió determinar la inmunopositividad sobre cardiomiocitos. Mediante inmunocitoquímica convencional se observó la tinción positiva para adiponectina, pero ésta desapareció al realizar la preadsorción del anticuerpo con la propia proteína.



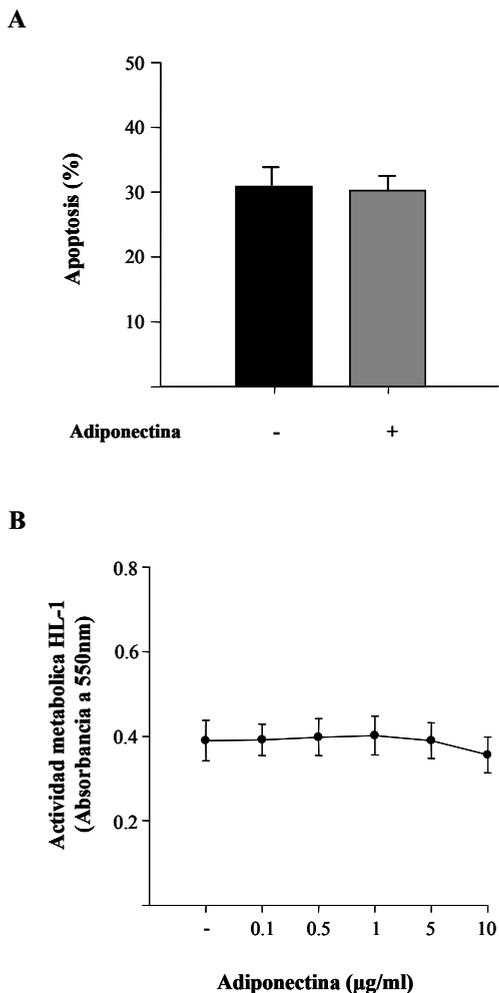
**Figura 6.** Captación de 2-deoxi-D-glucosa por cardiomiocitos. **Panel A.** Estudio tiempo-respuesta para la dosis 10  $\mu\text{g/ml}$  de adiponectina en células HL-1. Se observa una estimulación con adiponectina que se hace significativa a los 30 minutos ( $n=4$ ). El control positivo utilizado fue insulina 300 nM durante 20 minutos ( $p<0.001$ ,  $n=4$ ). **Panel B, Panel C.** Tratamiento durante 24 horas con adiponectina 10  $\mu\text{g/ml}$ , 1 hora con insulina 100 nM, o conjuntamente, en células HL-1 (**Panel B**,  $n=8$ ) y cultivo primario de cardiomiocitos de rata (**Panel C**,  $n=4$ ). Se observa incremento de la captación basal por adiponectina y de la estimulada por insulina. **Panel D.** Efecto del inhibidor de AMPK (araA) sobre la captación de glucosa estimulada por adiponectina en células HL-1. Células pretratadas 20 minutos con araA 2 mM y 2 horas con adiponectina 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $n=3$ ). Se observa disminución de la captación inducida por adiponectina. Significación estadística: \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .



**Figura 7.** Activación de AMPK por adiponectina en cardiomiocitos HL-1 analizada por Western Blot. **Panel A.** La administración de 10  $\mu$ g/ml de adiponectina induce la fosforilación de AMPK en Thr 172 de forma tiempo dependiente. Los lisados celulares se incubaron con un anticuerpo anti-fosfo-AMPK y anti-AMPK. La estimulación con adiponectina se llevó a cabo a tiempos de 5, 30 y 120 minutos. **Panel B.** Análisis estadístico de los niveles de fosforilación de AMPK en células tratadas durante distintos tiempos con adiponectina respecto al control. Análisis realizado a partir de 4 experimentos independientes (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

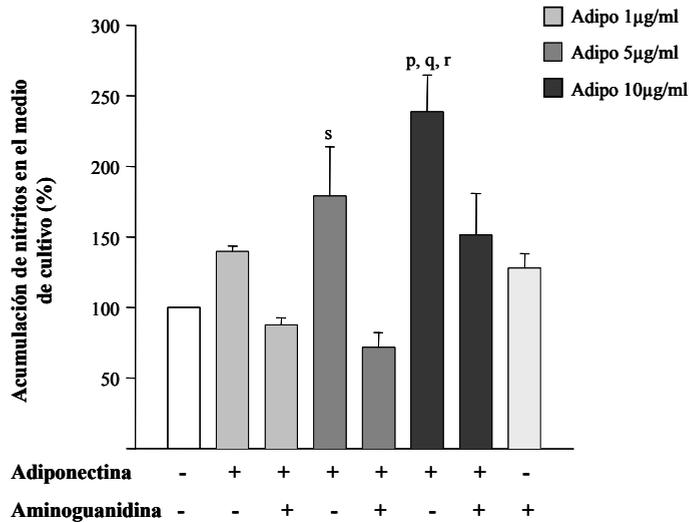


**Figura 8.** Captación de ácidos grasos inducida por adiponectina en cardiomiocitos HL-1. Estudio tiempo-respuesta de la administración de 10  $\mu\text{g/ml}$  de adiponectina. El tratamiento con adiponectina estimuló la captación de ácidos grasos marcados con BODIPY de forma tiempo dependiente. Se muestra el análisis estadístico de al menos tres experimentos independientes. Significación estadística: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

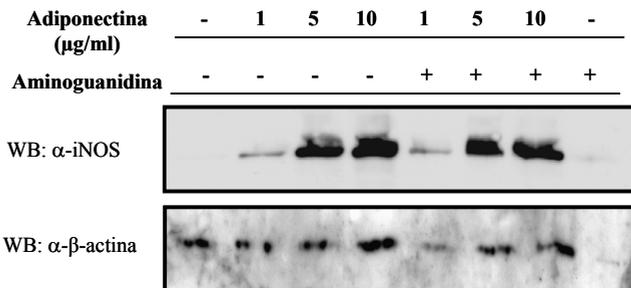


**Figura 9.** Efecto de adiponectina sobre la viabilidad y proliferación de cardiomiocitos. **Panel A.** La administración de 10 µg/ml de adiponectina no tuvo efecto sobre la viabilidad de cardiomiocitos neonatales de rata, determinada por Hoechst tras 48 horas de serodeprivación. Análisis de tres experimentos independientes. **Panel B.** El tratamiento dosis-respuesta con adiponectina durante 24 horas no modificó los niveles de proliferación basal de cardiomiocitos HL-1 determinados por MTT. Análisis de tres experimentos independientes.

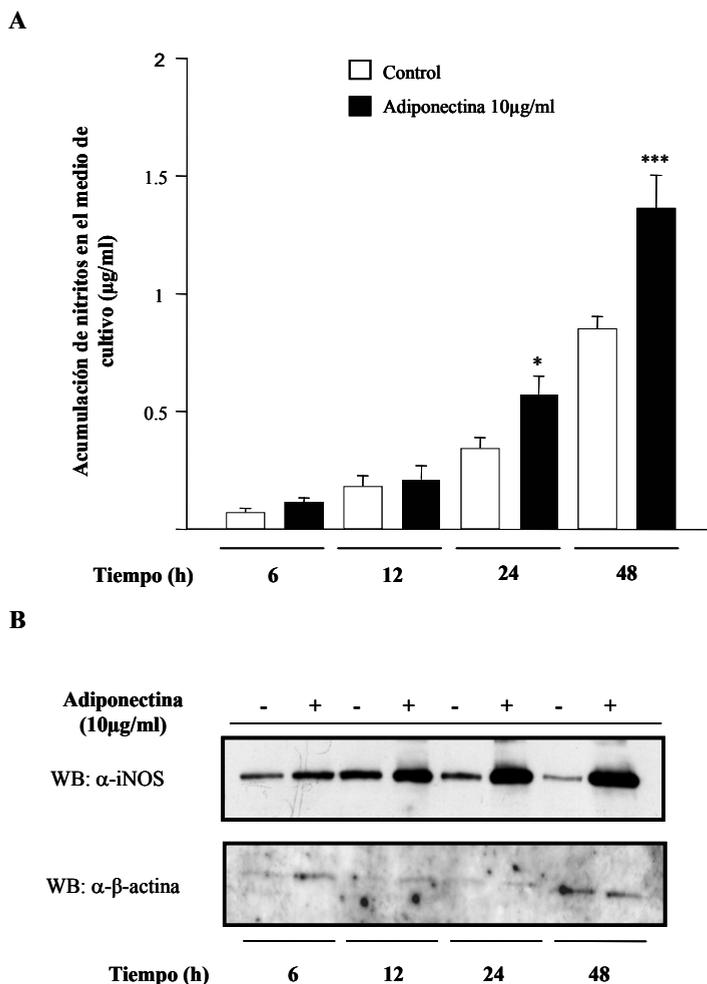
A



B



**Figura 10.** Efecto de adiponectina sobre la producción de ON y expresión de iNOS en cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel A.** El estudio dosis-respuesta a 24 horas del tratamiento con adiponectina (1, 5, 10 µg/ml) mostró que la hormona es capaz de inducir la producción de ON por parte de los cardiomiocitos de forma dosis dependiente. La presencia en el medio de cultivo del inhibidor de iNOS, aminoguanidina (1 mM), disminuyó la acumulación de nitritos inducida por adiponectina. Análisis estadístico de tres experimentos independientes. Significación estadística: p: Ad 10 vs Cont ( $p < 0.001$ ), q: Ad 10 vs Aminog ( $p < 0.01$ ), r: Ad 10 vs Ad 10+Aminog ( $p < 0.05$ ), s: Ad 5 vs Ad 5+Aminog ( $p < 0.05$ ). **Panel B.** El tratamiento con adiponectina durante 24 horas induce de forma dosis dependiente la expresión proteica de iNOS, analizada por Western Blot. El pretratamiento con aminoguanidina no afecta a los niveles de expresión de la proteína. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-β-actina.



**Figura 11.** Efecto de adiponectina sobre la producción de ON y expresión de iNOS en cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel A.** El estudio tiempo-respuesta con adiponectina a una dosis 10  $\mu\text{g/ml}$  indujo la acumulación de nitritos en el medio de cultivo de forma tiempo dependiente. La significación estadística se observó a partir del tiempo de 24 horas. Análisis estadístico de tres experimentos independientes (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). **Panel B.** El análisis mediante Western Blot de la expresión de iNOS mostró que la estimulación con adiponectina (10 $\mu\text{g/ml}$ ) induce la expresión de iNOS de forma tiempo dependiente. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti- $\beta$ -actina.

## **DISCUSIÓN ADIPONECTINA**



La identificación del tejido adiposo como un órgano endocrino capaz de producir y secretar sustancia bioactivas, está proporcionando parte del conocimiento necesario para la lucha contra las consecuencias adversas de la obesidad en los países desarrollados. Parte de estas sustancia bioactivas, denominadas adipocitoquinas, están participando en la regulación y control de la homeostasis corporal a través de su acción a nivel sistémico (Rajala MW & Scherer P. 2003). La importancia de éstas viene dada por las alteraciones que sufren en sus patrones normales de secreción como consecuencia de los cambios drásticos de tamaño que puede sufrir el tejido adiposo. De hecho, existen evidencias de que los cambios en la producción y secreción de las adipocitoquinas están involucrados en el desarrollo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares (Matsuzawa Y. 2005). La obesidad se considera un estado metabólico asociado a resistencia a insulina, diabetes, hiperglucemia, dislipemia, hipertensión, y a estados pro-trombóticos y pro-inflamatorios (Grundy SM. 2004). En particular, la diabetes tipo 2 se considera una patología importante por el papel que desempeña en la progresión hacia enfermedad cardiovascular. Aunque la relación entre diabetes y obesidad no está del todo clara, se sabe que la resistencia a inulina tiene mucho que ver en esta relación, ya que es una de las primeras causas que conducen al desarrollo de diabetes (Kahn BB & Flier JS. 2000). La resistencia a insulina es un factor que, junto con alteraciones del metabolismo lipídico, contribuye al daño aterosclerótico vascular en diabetes, y que aparece ligado a distintas anomalías metabólicas tales como hipertensión e hiperlipidemia, de claro pronóstico negativo en enfermedad cardiovascular (Kahn BB & Flier JS. 2000). Todas estas alteraciones se engloban dentro del síndrome metabólico, y suponen claros factores de riesgo cardiovascular. La existencia de una relación entre obesidad y los otros componentes del síndrome metabólico está bastante clara, pero los mecanismos que subyacen a esta relación aún están por determinar (Matsuzawa Y. 2005). El conocimiento de estos mecanismos supondría un importante avance en la lucha contra la gran incidencia de accidentes cardiovasculares que ocurren actualmente como consecuencia de la obesidad y, en último término, del síndrome metabólico.

Se ha sugerido que la adiponectina pueda ser el nexo de unión entre obesidad, resistencia a insulina y aterosclerosis (Goldstein BJ & Scalia R. 2004, Shimada K et al. 2004).

Esta idea viene respaldada por el hecho de que la adiponectina, al contrario que otras adipocitoquinas, se encuentra disminuida en estados tales como obesidad y diabetes tipo 2 (Arita Y et al. 1999, Hotta K et al. 2000). El principal efecto de la adiponectina es el aumentar la sensibilidad a la insulina a tejidos implicados en el metabolismo de glucosa y lípidos, de forma que se disminuyen los estados de resistencia a insulina (Goldstein BJ & Scalia R. 2004). Esto se debe a una reducción en los niveles plasmáticos de glucosa y lípidos gracias a su captación y metabolización en tejidos como hígado y músculo esquelético. Además también se sabe que la adiponectina presenta propiedades anti-aterogénicas y anti-inflamatorias, ya que se ha comprobado que es capaz de inhibir la adhesión de monocitos al endotelio, inducida por TNF- $\alpha$ , y la expresión de moléculas de adhesión, reduciendo el riesgo de producción de ateroma (Ouchi N. 1999). Una demostración clara del efecto anti-aterogénico de la adiponectina, viene dada por el hecho de que ratones deficientes para esta hormona presentan un engrosamiento de la neointima y lesiones arteriales graves que se revierten con la administración de adiponectina (Matsuda M et al. 2002). Además, la adiponectina guarda una estrecha relación con el sistema cardiovascular debido a otras acciones. Se ha comprobado que esta hormona está presente en el miocardio de pacientes que han sufrido infarto secundario a lesión isquémica, y que esta presencia desempeña un papel importante en el remodelado del miocardio afectado tras el daño isquémico (Ishikawa Y et al. 2003). Por otro lado, se ha encontrado una relación directa entre adiponectina y proteína C reactiva, un marcador de inflamación y factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad coronaria (Ouchi N et al. 2003). Se ha observado que los niveles plasmáticos de adiponectina se correlacionan negativamente con los niveles proteicos de proteína C reactiva (PCR), es más, ratones deficientes en adiponectina presentaron una expresión elevada de PCR, indicando que la hormona regula negativamente la expresión de esta proteína (Ouchi N et al. 2003). También se ha comprobado que un aumento en las concentraciones de adiponectina se asocian a un menor riesgo de sufrir enfermedad de la arteria coronaria en diabéticos tipo 1 (Costacou T et al. 2005), y que niveles elevados de adiponectina se asocian con un menor riesgo de sufrir infarto de miocardio en varones (Pischon T et al. 2004). Siguiendo esta relación de efectos positivos de la adiponectina sobre el sistema

cardiovascular, se ha descrito que los niveles de adiponectina están disminuidos en paciente hipertensos, y que la hipoadiponectinemia es un factor de riesgo que predispone a hipertensión (Iwashima Y et al. 2004). Un trabajo diseñado para la búsqueda de mutaciones en el gen de adiponectina que pudieran estar relacionadas con enfermedad de la arteria coronaria, mostró que existe una mutación en dicho gen asociada con esta enfermedad además de con síndrome metabólico (Ohashi K et al. 2004). Por último, se ha comprobado que la adiponectina actúa como modulador de señales hipertróficas en el corazón, inhibiendo la hipertrofia cardíaca desarrollada en respuesta a una sobrecarga de presión (Shibata R et al. 2004a).

Desde el reciente descubrimiento de adiponectina y su clasificación como adipocitoquina, se creía que esta hormona era sintetizada de forma exclusiva por el tejido adiposo (Scherer PE et al. 1995). Sin embargo, recientemente, algunos estudios han mostrado que no es así. Se ha observado que la administración de  $\text{CCl}_4$  a ratones, induce la síntesis hepática de adiponectina (Yoda-Murakami M et al. 2001). También se ha visto que al incubar miotubos humanos con un sobrenadante rico en adiponectina procedente del cultivo de células HEK293, se inducía la expresión génica de adiponectina en los miotubos (Staiger H et al. 2003). Asimismo se ha demostrado la expresión y secreción de adiponectina por células precursoras de hueso u osteoblastos (Berner HS et al. 2004); y por último se ha visto que la síntesis de adiponectina puede ser inducida tanto en miotubos cultivados como en músculo en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias, de tal forma que la síntesis de adiponectina puede ser regulada tanto *in vivo* como *in vitro* por estímulos inflamatorios (Delaigle AM et al. 2004). Todos estos trabajos suponen demostraciones de la expresión de adiponectina de forma inducida en tejidos distintos al adiposo. De forma más reciente, se están publicando trabajos que hablan de una expresión de adiponectina basal (no inducida) en tejidos distintos del adiposo. Un ejemplo es el trabajo de Kaser S et al. (2005), donde se hace una comparación entre los niveles de ARNm de adiponectina en biopsias de hígado de pacientes con distintas patologías. Otro ejemplo es el trabajo de Corbetta S et al. (2005), demostrando la expresión de la hormona en diversos tejidos fetales humanos distintos del adiposo. Este estudio muestra dicha expresión en tejidos tales como fibras de músculo esquelético, células de músculo liso del intestino, paredes arteriales,

etc., si bien la expresión en tejidos no adiposos muestra un decaimiento a lo largo de la progresión de la gestación. Sin embargo, es paradójico que, a pesar de la importancia que esta hormona tiene en el sistema cardiovascular, no se haya publicado ningún trabajo en el que se investigue la síntesis de adiponectina por parte de cardiomiocitos.

Los resultados presentados en esta tesis ponen de manifiesto por primera vez la síntesis de adiponectina por cardiomiocitos. El estudio se ha desarrollado en cardiomiocitos de tres especies distintas: murinos, humanos y de rata. La expresión del ARNm de adiponectina, su síntesis, y su secreción al medio de cultivo, se detectaron tanto en cardiomiocitos de la línea celular de ratón HL-1, derivada de cardiomiocitos atriales de ratón, como en cardiomiocitos humanos en cultivo. Aunque la expresión del ARNm de adiponectina no se pudo determinar en cardiomiocitos neonatales de rata de 24-48 horas de edad, ésta sí que se observó en corazón de rata adulta, lo que estaría sugiriendo que la expresión génica de la hormona se da en estadios del crecimiento posteriores al neonatal. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la expresión génica, síntesis y secreción de adiponectina por cardiomiocitos, determinado por RT-PCR, inmunohistoquímica, y radioinmunoensayo respectivamente. Si bien los niveles de expresión de adiponectina detectados en el medio de cultivo de cardiomiocitos son menores a los observados en plasma, este hecho no debería de suponer ninguna duda sobre la eficiencia de secreción de la hormona por parte de las células cardíacas en términos de regulación de tipo autocrino/paracrino. Es más, una publicación reciente ha determinado que 100 mg de tejido adiposo humano en cultivo (procedente de pacientes de peso normal) produce una concentración de adiponectina *in vitro* del orden de 38 ng/ml (Hoffstedt J et al. 2004), cifra que estaría en el rango de las concentraciones determinadas para cardiomiocitos cultivados *in vitro*. Por tanto, se podría especular sobre la existencia de un posible mecanismo de señalización paracrino y/o autocrino de adiponectina en cardiomiocitos.

La expresión de los receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) también se analizó en cardiomiocitos de las tres especies. Este análisis se hizo necesario para la demostración de que el modelo experimental sobre el que se desarrolló el trabajo era válido. Sin embargo, la expresión de los receptores en el corazón no es un dato nuevo, ya que Yamauchi T

et al., en el año 2003a, publicaron un trabajo donde se clonaron ambos receptores de adiponectina y se demostró su presencia en el tejido cardíaco. En concordancia con estos datos previos, los resultados obtenidos por RT-PCR mostraron la expresión génica de los receptores en la línea de cardiomiocitos HL-1 y cardiomiocitos humanos en cultivo. En ambos casos, los niveles de ARNm de AdipoR1 fueron superiores a los de AdipoR2, coincidiendo con los visto en corazón total de ratón y humano por Yamauchi T et al. A este nivel, se plantea muy interesante el dato obtenido con el estudio desarrollado en cardiomiocitos neonatales de rata de 24-48 horas de edad. En este caso se observó la expresión del ARNm de AdipoR1, pero no así el de AdipoR2. Curiosamente, tampoco se pudo encontrar la expresión de AdipoR2 en el hígado de neonatos de esta edad, tejido de mayor producción de este receptor (Yamauchi T et al. 2003a). La presencia del ARNm de AdipoR2 solo se pudo determinar al realizar un estudio en corazones totales de distintas edades, comprobándose la aparición del ARNm de forma evidente aproximadamente a los 25 días de edad. El resultado obtenido fue el mismo al realizar la distinción entre machos y hembras, lo que estaría indicando que no existe dimorfismo sexual en la aparición de la expresión de AdipoR2. Una posible explicación tendría que ver con los cambios que se producen en el metabolismo del corazón en la transición de la vida fetal a la vida neonatal y adulta. En esta transición se da una evolución en cuanto a la preferencia por el sustrato que va a ser utilizado por el corazón para la obtención de energía, de forma que se pasaría de la utilización de lactato y glucosa como fuente de energía durante la vida fetal, a la utilización de ácidos grasos durante la vida adulta (Lopaschuk GD et al. 1992). Muy recientemente se ha publicado un estudio de los niveles de expresión de los receptores de adiponectina durante el desarrollo cardíaco neonatal de rata (Steinmetz M et al. 2005). Se muestra que el ARNm de AdipoR1 se expresa ya en el nacimiento y que esta expresión no varía durante el desarrollo postnatal; sin embargo, el ARNm de AdipoR2, aunque también aparece en corazones al día cero, sufre un aumento en la expresión con el paso de los días. Ambos estudios coinciden en mostrar de forma clara que existe una regulación sobre la expresión de AdipoR2, y que ésta se hace más evidente conforme aumenta la edad de los neonatos. La justificación de la disparidad entre los resultados de este artículo y los de esta tesis podría estar en la diferencia de

sensibilidad existente entre las técnicas de detección empleadas, RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real, siendo esta última una técnica de mayor sensibilidad. En cualquier caso, la interpretación que los autores ofrecen de la sobreexpresión génica de AdipoR2 en el período postnatal, coincide con la planteada en esta tesis, y estaría en relación con el cambio de sustrato utilizado como fuente de energía en este período. Además, se sabe que la sobre-expresión de los receptores de adiponectina en miocitos C2C12 aumenta la oxidación de ácidos grasos. Esta oxidación estaría en parte mediada por la activación de los receptores PPARs (Yamauchi T et al. 2003a), cuyos genes también aumentan de expresión durante el desarrollo postnatal, controlando los mecanismos de oxidación de los ácidos grasos. Este dato iría en la línea de los resultados expuestos anteriormente y confirmaría la hipótesis del cambio de preferencia por el sustrato energético. De todas formas, la relevancia que este dato pueda alcanzar, se ve sometida a la necesidad de un mayor estudio, si bien se podría plantear que éste sería un mecanismo adaptativo de respuesta cardíaca a diferentes estados fisiológicos y patológicos.

Los efectos desencadenados en cardiomiocitos por la unión entre adiponectina y sus receptores no se habían estudiado hasta la fecha. Las primeras evidencias experimentales sobre efectos *in vitro* de la adiponectina en modelos celulares no cardiomiocitarios, aparecen en el año 2002, con dos trabajos realizados en miocitos C2C12 (Maeda N et al. 2002, Yamauchi T et al. 2002). En estos trabajos se refleja el efecto de la adiponectina sobre la captación de glucosa, observándose un incremento en los niveles basales, y en la captación estimulada por insulina. En el estudio de Yamauchi T et al., también se demuestra por primera vez el efecto estimulador de la adiponectina sobre la captación y oxidación de ácidos grasos. De la misma manera, un trabajo realizado en adipocitos de rata demuestra que la estimulación con adiponectina incrementa la captación de glucosa (Wu X et al. 2003). Esta serie de resultados obtenidos *in vitro* llevaron a plantear la posibilidad de que adiponectina tuviera efectos similares sobre cardiomiocitos. El estudio de la captación de glucosa y ácidos grasos por cardiomiocitos tratados con adiponectina, puso de manifiesto que la hormona era capaz de estimular ambos procesos en este tipo celular de forma tiempo dependiente, mostrándose en concordancia con los resultados previos. Si bien la estimulación de la captación de glucosa se hizo evidente a los 5

minutos y persistió hasta las 24 horas, la captación de ácidos grasos se vio claramente a 30 minutos y se mantuvo hasta las 2 horas, produciéndose un decaimiento progresivo a tiempos superiores. Incluso se observó que la adiponectina era capaz de incrementar la captación de glucosa estimulada por insulina, al igual que se había mostrado anteriormente en otros tipos celulares (Maeda N et al. 2002, Yamauchi T et al. 2002).

La adiponectina tiene como una de sus principales acciones a nivel sistémico regular la homeostasis de la glucosa. Los resultados aquí mostrados estarían indicando que el corazón es un órgano diana para la adiponectina en cuanto a la regulación del metabolismo de la glucosa. Esto permitiría especular que la acción de la adiponectina a nivel cardíaco estaría relacionada con la reducción de estados de resistencia a insulina que ejerce a nivel sistémico. Se ha descrito que la disminución de los niveles plasmáticos de ácidos grasos mediada por adiponectina interviene en la reducción de estados de resistencia a insulina. Por lo tanto, el hecho de que adiponectina también estimule la captación de ácidos grasos en cardiomiocitos, estaría apoyando la idea de que la producción a nivel local de esta hormona participa en la regulación de los estados de resistencia a insulina a nivel cardíaco. A este nivel quedaría por demostrar si adiponectina también aumenta la oxidación de los ácidos grasos en cardiomiocitos.

La demostración de que la adiponectina participa en la regulación de la captación de glucosa y ácidos grasos por parte de los cardiomiocitos, derivó en el estudio de la vía molecular implicada en estas acciones. Este estudio se basó en otros trabajos donde se había comprobado que adiponectina era capaz de activar AMPK (Yamauchi T et al. 2002, Tomas E et al. 2002, Wu X et al. 2003). La AMPK o quinasa dependiente de AMP, es una proteína que actúa como regulador del estado energético de la célula. La activación de ésta va a depender del aumento o disminución de la relación AMP/ATP, así, cuando el gasto energético de la célula aumenta, se va a producir un incremento de la relación AMP/ATP, lo que desencadena en la activación de AMPK (Winder WW & Hardie DG. 1999). Dicha activación tiene como objetivo el que la célula comience a generar ATP para la obtención de energía. La implicación de esta quinasa como factor regulador del metabolismo de glucosa y lípidos es bien conocida (Hardie DG. 2003). Su activación tiene como efecto cambios metabólicos que podrían ser beneficiosos en

pacientes con diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (Winder WW & Hardie DG. 1999). Entre estas acciones metabólicas estaría el aumento de captación y metabolismo de la glucosa por músculo y otros tejidos, disminución de la producción hepática de glucosa, y disminución e incremento de la síntesis y oxidación de ácidos grasos respectivamente (Hardie DG. 2003). Como ya se ha comentado anteriormente, son varios los trabajos existentes en la bibliografía que muestran la intervención de esta quinasa en las acciones de adiponectina. Así, por ejemplo, algunos de los trabajos existentes sobre las acciones *in vitro* de adiponectina en miocitos C2C12 y adipocitos, mostraron que éstas estaban mediadas por AMPK (Yamauchi T et al. 2002, Wu X et al. 2003). Esto también se comprobó en experimentos *in vitro*, donde la incubación de músculo extensor de rata en presencia de adiponectina, inducía la activación de AMPK, derivando en un aumento de la captación de glucosa y reducción de malonil CoA (Tomas E et al. 2002). Otro efecto que se ha demostrado que ejerce la adiponectina a través de la activación de AMPK es la estimulación de angiogénesis en células endoteliales, es decir, favorece la diferenciación de células endoteliales en estructuras similares a capilares permitiendo la síntesis de nuevos vasos sanguíneos (Ouchi N et al. 2004). También se ha visto que la activación de AMPK por adiponectina en células endoteliales, deriva en la producción de óxido nítrico por eNOS (sintasa de óxido nítrico endotelial) (Chen H et al. 2003), y que en células endoteliales humanas de venas umbilicales la adiponectina tiene un efecto citoprotector frente a apoptosis dependiente de la actividad de AMPK (Kobayashi H et al. 2004). Los resultados aquí presentados en cardiomiocitos HL-1, mostraron que el tratamiento con adiponectina fue capaz de estimular la fosforilación de AMPK. Así, se plantea la hipótesis de si el efecto estimulador de adiponectina sobre la captación de glucosa en cardiomiocitos, podría estar mediado a través de AMPK, idea que venía avalada por los resultados obtenidos en otros modelos celulares descritos anteriormente (Yamauchi T et al. 2002, Wu X et al. 2003). Además, existen otros datos que también estarían apoyando esta idea. Por ejemplo, se ha visto que la activación de AMPK a través de la vía del óxido nítrico en músculo cardíaco aislado, lleva consigo un incremento en la captación de glucosa y en la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 del citoplasma a la superficie celular (Li J et al. 2004); también se ha descrito que

AMPK estaría mediando la captación de glucosa inducida por isquemia en el corazón de ratón (Russell RR et al. 2004); y que la estimulación de cardiomiocitos de rata adultos con dinitrofenol (DNP), un modelo de hipóxia, activa AMPK e induce un incremento de la captación de glucosa (Pelletier A et al. 2005).

Los resultados mostrados en este trabajo supondrían un nuevo argumento a favor de la idea de que AMPK podría mediar la captación de glucosa estimulada por adiponectina. Se observó que la administración de adiponectina a células HL-1 estimulaba la captación de glucosa desde tiempos muy cortos, y algo muy similar ocurrió con la activación de AMPK. Por tanto existe una correlación temporal entre la activación de AMPK y la estimulación de la captación de glucosa por parte de adiponectina. De cualquier modo, la demostración más clara de que la estimulación de la captación de glucosa por adiponectina en cardiomiocitos HL-1 estaba mediada por AMPK, se puso de manifiesto al utilizar un inhibidor farmacológico específico de AMPK (araA). La presencia de araA disminuía de forma drástica la captación inducida por adiponectina. Un efecto muy similar ya se había observado con anterioridad en adipocitos, donde el inhibidor suprimía por completo el incremento en la captación de glucosa inducido por adiponectina (Wu X et al. 2003).

Nuestro trabajo plantea la existencia de una relación entre adiponectina, AMPK y corazón. Recientemente se ha comprobado que la adiponectina actúa inhibiendo señales hipertróficas en el miocardio a través de la activación de AMPK (Shibata R et al. 2004a). Este trabajo muestra que en ratones deficientes en adiponectina, una sobrecarga de presión inducía hipertrofia miocárdica y reducía la señalización a través de AMPK. Este efecto regulador también se comprobó en cardiomiocitos cultivados (Shibata R et al. 2004a). Estos mismos autores han demostrado que la administración de adiponectina a ratones deficientes en la hormona, inhibe la apoptosis miocárdica inducida por isquemia-reperfusión a través de un mecanismo dependiente de AMPK, hecho que demostraron con experimentos *in vitro* sobre cardiomiocitos aislados (Shibata R et al. 2005). Por tanto, se muestra a adiponectina como un factor modulador de señales hipertróficas y apoptóticas en el corazón, y se sugiere que el eje de señalización adiponectina-AMPK podría actuar como nexo funcional entre el tejido adiposo y el

corazón (Shibata R et al. 2004a). A esta idea se le podrían sumar los datos presentados en este trabajo, donde se demuestra que la adiponectina está regulando el metabolismo de los cardiomiocitos, regulación que pasaría por la acción de AMPK. Pero profundizando un poco más en la relación adiponectina/AMPK y corazón, el efecto de la adiponectina sobre el metabolismo de cardiomiocitos y la capacidad de éstos para sintetizar y secretar la hormona, permitirían sugerir la posibilidad de que exista un eje autocrino/paracrino regulador de la viabilidad y metabolismo de cardiomiocitos en el que participaría AMPK. Este eje regulador dependería de la acción de la adiponectina sintetizada por el propio corazón. Sin embargo, los datos previos aportados por el único estudio que ha investigado los efectos de la adiponectina sobre el metabolismo del corazón, muestran que la hormona es capaz de incrementar la oxidación de ácidos grasos en corazones de conejo recién nacidos, pero que esta acción no dependería de la activación de AMPK (Onay-Besikci A et al. 2004). Una posible explicación de este hecho, que también puede explicar la diferencia respecto a nuestros resultados, sería la diferencia estructural existente entre las formas de adiponectina utilizadas. El trabajo de Onay-Besikci A et al., utiliza la forma globular de adiponectina, mientras que en nuestros ensayos se utilizó adiponectina de forma larga. Las diferencias estructurales existentes entre ambas, así como la posibilidad de formar estructuras de alto orden molecular, pueden ser las causas determinantes de las diferencias encontradas entre ambos trabajos. A este hecho habría que sumarle la diferencia que plantea el uso de un sistema neonatal, como son los corazones de conejo, frente al uso de un sistema adulto como es la línea de cardiomiocitos HL-1. Por tanto, en el trabajo de Onay-Besikci A et al., AMPK no estaría formando parte de ese posible eje cardíaco regulador, aunque no se puede descartar que éste exista y esté actuando sobre otros procesos metabólicos.

Si bien la adiponectina se mostró como un agente modulador del metabolismo de los cardiomiocitos, esto no ocurrió al analizar su efecto sobre la proliferación y viabilidad celular. Nuestros resultados muestran que la presencia de adiponectina en el medio de cultivo celular no es capaz de proteger a los cardiomiocitos neonatales frente a apoptosis inducida por serodeprivación. En cuanto a la proliferación de cardiomiocitos HL-1, el tratamiento con

adiponectina no fue capaz de modificar los niveles basales de la misma. La bibliografía existente respecto a estos temas no es muy extensa, solamente aparece reflejado un trabajo que describa la acción de adiponectina sobre la apoptosis a nivel cardíaco (Shibata R et al. 2005). Sin embargo, la mayoría de los datos publicados respecto a adiponectina y apoptosis en otros tipos celulares, parecen indicar que la hormona puede actuar como agente anti-apoptótico. El tratamiento de células beta pancreáticas con adiponectina ejerce un efecto protector frente a apoptosis inducida por citoquinas y ácidos grasos (Rakatzi I et al. 2004). Este sería un hallazgo de relevancia fisiológica, ya que la apoptosis hepática inducida por citoquinas e inducida por lipotoxicidad, está íntimamente relacionada con el desarrollo de diabetes tipo 1 y tipo 2 respectivamente. Incluso la apoptosis de células beta inducida por ácidos grasos se ha asociado con diabetes tipo 2 relacionada con obesidad (Rakatzi I et al. 2004). Por otro lado, la administración de adiponectina a ratones obesos mejora el daño hepático inducido por LPS (Masaki T et al. 2004). Este efecto incluye una mejora de los cambios o procesos apoptóticos que se dan en los hepatocitos de estos ratones sometidos a estados inflamatorios, como es el tratamiento con endotoxina (Masaki T et al. 2004). Esto demostraría que la adiponectina es claramente un modulador de procesos inflamatorios. Otro modelo celular en el que se ha estudiado el efecto de la adiponectina sobre la regulación de apoptosis es la célula endotelial. Aquí los datos existentes muestran que el efecto regulador es algo más complejo. Dos trabajos publicados presentan a la adiponectina como un agente anti-apoptótico, mientras que un tercer trabajo se inclinaría por lo contrario. La apoptosis de células HUVECs inducida tanto por privación de suero como por el tratamiento con angiotensina II, se veía reducida de forma dosis dependiente por el tratamiento con adiponectina (Kobayashi H et al. 2004, Lin LY et al. 2004). Por el contrario, se ha descrito que la adiponectina puede presentar actividad anti-tumoral y anti-angiogénica, debida a una inducción de la apoptosis de células endoteliales a través de la activación de caspasas (Brakenhielm E et al. 2004), aunque los datos existentes a este respecto son contradictorios, ya que otros autores han demostrado propiedades angiogénicas de adiponectina en células endoteliales (Ouchi N et al. 2004). En cuanto a los efectos de adiponectina sobre la proliferación celular, Arita Y et al. (2002), han comprobado

que adiponectina inhibe la proliferación de células vasculares de músculo liso *in vitro* e *in vivo*, ya que en ratones deficientes en la hormona, la ausencia de ésta producía un incremento en la proliferación de las células (Matsuda M et al. 2002). Este hecho está íntimamente relacionado con la acción anti-aterogénica de adiponectina. Las acciones vasculares protectoras de adiponectina también pasan por la inhibición de la proliferación inducida por LDL oxidado en células endoteliales (Motoshima H et al. 2004). En concordancia con lo anteriormente descrito, de forma muy reciente se ha mostrado que la adiponectina inhibe la proliferación inducida por el tratamiento con varios factores de crecimientos sobre células aórticas de músculo liso, mediante su unión a dichos factores (Wang Y et al. 2005). Pero contrariamente a estos trabajos, la adiponectina estimula la proliferación de células osteoblásticas, actuando sobre el proceso de remodelado óseo (Berner HS et al. 2004). Este es el único trabajo que pone de manifiesto un efecto proliferativo de adiponectina.

Mientras que todos estos trabajos mencionados relatan acciones de adiponectina sobre apoptosis y proliferación inducidas, nuestros datos se refieren a estados basales de proliferación y viabilidad. De hecho, Wang Y et al., demuestran que la adiponectina inhibe la proliferación celular inducida por factores de crecimiento, pero la hormona por sí sola no tiene efecto sobre la proliferación celular. Por lo tanto, resulta de enorme interés el estudio de los efectos de adiponectina sobre apoptosis y proliferación, pero en otras condiciones experimentales como podría ser daño cardíaco, de esta forma se ampliaría el conocimiento de las acciones cardíacas de adiponectina relacionadas con condiciones patológicas. Durante la redacción de esta tesis, Shibata R et al. (2005), han demostrado que ratones deficientes en adiponectina sometidos a daño por isquemia-reperfusión, desarrollaron apoptosis miocárdica capaz de ser revertida mediante la administración de la hormona. Asimismo, comprobaron que adiponectina ejercía este mismo efecto anti-apoptótico sobre cardiomiocitos cultivados (Shibata R et al. 2005).

El hecho de que la adiponectina sea capaz de inducir la producción de óxido nítrico en cardiomiocitos, supone la primera demostración a este respecto. Más aún, la implicación de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), supone un dato totalmente novedoso dentro del conocimiento concerniente a los efectos de adiponectina sobre la producción de óxido nítrico.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la administración de adiponectina a cardiomiocitos neonatales de rata, tiene un efecto inductor de la producción de óxido nítrico de forma tanto dosis como tiempo-dependiente, y que la presencia de un inhibidor de iNOS es capaz de revertir casi totalmente dicho efecto. Hasta la fecha, los trabajos publicados muestran que la adiponectina promueve la síntesis de óxido nítrico en células endoteliales y a través de la sintasa endotelial eNOS (Chen H et al. 2003, Hattori Y et al. 2003, Motoshima H et al. 2003, Tan KC. 2004, Xi W et al. 2005). Se sabe que la presencia de ON es fundamental en la regulación de la función de las células endoteliales, ya que dicha molécula actúa como uno de los principales mediadores de la vasodilatación dependiente de endotelio. De hecho, estados de hipoadiponectinemia se asocian en humanos con disfunción endotelial (Tan KC et al. 2004, Shimabukuro M et al. 2003). Por otro lado, la relación existente entre resistencia a insulina y disfunción celular del endotelio vascular podría estar relacionada con la disminución en los niveles de adiponectina. El hecho de que ratones *knockout* para la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS), desarrollaran hipertensión y resistencia a insulina (Duplain H et al. 2001), podría estar apoyando esta idea. Además, recientemente se ha publicado un trabajo donde el bloqueo crónico de la síntesis de óxido nítrico en ratas deriva en una hipoadiponectinemia (Hattori S et al. 2005). Pero los resultados que nosotros planteamos atribuyen un papel a iNOS en la producción de óxido nítrico inducida por adiponectina en cardiomiocitos. La bibliografía existente solamente refleja dos trabajos donde se relacionan ambas moléculas, pero lo hacen de forma inversa a nuestros resultados, es decir, muestran el papel que iNOS tiene sobre la expresión de adiponectina. El primero de estos trabajos comprueba como la administración de citoquinas pro-inflamatorias al músculo esquelético, *in vivo* e *in vitro*, es capaz de inducir la expresión de adiponectina mediada por la producción de óxido nítrico por parte de iNOS (Delaigle AM et al. 2004). El segundo de los trabajos, utilizando modelos de ratones salvajes y deficientes en iNOS, mostró que los niveles plasmáticos de adiponectina no se veían alterados por la presencia o no de la sintasa, ni siquiera cuando a estos ratones se les administró LPS (Gómez-Ambrosi J et al. 2005). Ambos estudios muestran resultados más o menos divergentes, el primero hablaría de un posible papel anti-inflamatorio de adiponectina en respuesta a un

estímulo inflamatorio, y el segundo no encontraría participación de adiponectina en la respuesta inflamatoria aguda.

El óxido nítrico desempeña un papel como modulador de la función cardíaca tanto en condiciones normales como patológicas (Sarkar D et al. 2001). En el corazón, la sintasa endotelial eNOS es la encargada de producir el ON de forma moderada. Esta proteína está presente en el endotelio vascular, en miocardio y miocitos auriculares y ventriculares. Por su lado, la sintasa inducible iNOS, está presente en el miocardio y endocardio, y es la encargada de la liberación de grandes concentraciones de ON (Sarkar D et al. 2001). Esta proteína puede ser inducida por diversos estímulos inflamatorios (Sarkar D et al. 2001), por lo que se ha sugerido que la inducción de iNOS presenta un papel central en la etiología de las cardiomiopatías inflamatorias. Se ha visto que la actividad de iNOS está aumentada en el miocardio de pacientes con cardiomiopatía dilatada, miocarditis, etc. (de Belder AJ et al. 1993, de Belder AJ et al. 1995). Aunque también hay que reseñar que se ha demostrado la expresión de iNOS en corazones normales, de forma independiente a procesos pro-inflamatorios (Haywood GA et al. 1996). En concordancia con una visión proinflamatoria de la actividad de iNOS, se muestra un trabajo publicado por Perreault M & Marette A (2001), donde se observa que el bloqueo de la sintasa de óxido nítrico inducible previene la resistencia a insulina en músculo inducida por obesidad. Se sabe que la producción excesiva de ON a través de iNOS, está implicada en la patogénesis de desórdenes metabólicos asociados a inflamación, tales como aterosclerosis y diabetes tipo 2 asociada a obesidad (Perreault M & Marette A. 2001). Curiosamente, tales estados se caracterizan por una disminución de los niveles plasmáticos de adiponectina, lo que podría suponer un papel anti-inflamatorio de ésta. De hecho, hoy está demostrado que la adiponectina presenta importantes efectos anti-inflamatorios, ya que es capaz de reducir la producción y actividad de TNF- $\alpha$ , inhibe la producción de IL-6 e induce citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-1, reduce la inducción de ICAM-1 y VCAM-1 y presenta propiedades anti-aterogénicas (Fantuzzi G. 2005). Pero a pesar de estos datos, actualmente también hay trabajos que reflejan un posible papel pro-inflamatorio de la hormona. Así, Lappas M et al. (2005), han presentado un trabajo en el que se muestra la capacidad de la adiponectina

para inducir la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. La administración de adiponectina a explantes de placenta y tejido adiposo subcutáneo humano, derivó en un aumento de la liberación de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y prostanglandinas (PGE<sub>2</sub>), que se vio revertido mediante la utilización de inhibidores anti-inflamatorios. Estos datos se muestran en concordancia con estudios previos en los que adiponectina induce una expresión elevada de ciclooxigenasa-2 y liberación de PGE<sub>2</sub> en preadipocitos (Yokota T et al. 2002, Yokota T et al. 2003).

Nuestros resultados muestran como adiponectina induce la producción de ON mediada por iNOS en cardiomiocitos. Por tanto, teniendo en cuenta que la producción de óxido nítrico por parte de iNOS se asocia principalmente a estados inflamatorios y a estados en los que aparece disfunción cardíaca (isquemia, cardiopatía, sepsis e insuficiencia cardíaca), nuestros resultados serían a priori contrarios a las propiedades anti-inflamatorias de la adiponectina y al papel positivo que juega a nivel cardiovascular. Pero esta idea no se puede afirmar con seguridad, principalmente por dos razones. La primera es que nuestros resultados no demuestran un efecto inflamatorio de adiponectina en cardiomiocitos. Esto sería un hecho por demostrar. La segunda, y más importante razón, es que actualmente existen pruebas de que la activación de iNOS también presenta efectos beneficiosos en el corazón. Un ejemplo sería el estudio de Chun TY et al. (2003), en el que se muestra que una hormona como la aldosterona, de claros efectos perjudiciales a nivel cardiovascular, reduce la expresión de iNOS y por tanto los niveles de ON en cardiomiocitos. Los autores interpretan este resultado diciendo que son necesarios unos niveles mínimos de ON para mantener la función cardíaca normal, y el hecho de que la aldosterona reduzca la expresión de iNOS podría, bajo ciertas condiciones, ser la causa de la bajada en los niveles mínimos de ON y resultaría en una pérdida de la función cardíaca óptima. Esta idea se apoya en otro trabajo en el que ratones *knockout* para eNOS con daño por isquemia y reperusión presentan un aumento en la producción de ON y la expresión de iNOS como respuesta adaptativa (Kanno S et al. 2000). Asimismo, otro trabajo demostró la expresión de iNOS en cardiomiocitos y miocardio de rata adulta normales, y sugiere que esta enzima participa en el mantenimiento de la homeostasis cardíaca, en contraposición a la idea de que solamente se expresa en respuesta a factores fisiológicos y patogénicos (Buchwalow IB et al.

2001). También existen trabajos que muestran que cuando iNOS es inhibida por endotoxemia (proceso inflamatorio) aumenta la disfunción vascular, se deprime la función cardíaca e incrementa la mortalidad (Poon BY et al. 2003).

Por lo tanto, estamos ante una enzima, iNOS, capaz de ejercer efectos tanto negativos como positivos a nivel cardíaco. Pero se necesitan estudios adicionales para tratar de determinar cual es el papel que está jugando iNOS sobre el metabolismo de los cardiomiocitos, y cual es el efecto que el óxido nítrico inducido por adiponectina tiene sobre estas células. Estos resultados abren una vía de investigación a desarrollar que permitiría llegar a conocer las acciones que adiponectina pueda ejercer a nivel cardiomiocitario a través de un efecto directo sobre la producción de óxido nítrico.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que la adiponectina podría no sólo estar ejerciendo sus efectos sistémicos a nivel cardiovascular, sino que un posible eje paracrino/autocrino podría actuar regulando el metabolismo de los cardiomiocitos. Esta idea se extrae de la novedosa demostración de que los cardiomiocitos son capaces de sintetizar y secretar adiponectina, y de que ésta presenta efectos sobre el metabolismo de glucosa y lípidos de dichas células. Además, dicha regulación hormonal sobre el metabolismo celular estaría implicando la acción de la quinasa dependiente de AMP, importante enzima reguladora del metabolismo energético, y de otras enzimas claves a nivel cardiovascular como iNOS.

## **CONCLUSIONES ADIPONECTINA**



1. Los cardiomiocitos son capaces de expresar, sintetizar y secretar adiponectina, así como de expresar y sintetizar los receptores de la misma, AdipoR1 y AdipoR2.
2. La adiponectina promueve la captación de glucosa y ácidos grasos por parte de los cardiomiocitos.
3. La adiponectina induce la activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) en cardiomiocitos.
4. La adiponectina no ejerce ningún efecto regulador sobre la proliferación y viabilidad basal de los cardiomiocitos.
5. La adiponectina estimula la síntesis de óxido nítrico por parte de los cardiomiocitos, siendo este efecto mediado por la sintasa de óxido nítrico inducible.



## **BIBLIOGRAFÍA**



**Adamczak M, Wiecek A, Funahashi T, Chudek J, Kokot F, Matsuzawa Y.** Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2003, 16:72-5.

**Adamopoulos S, Parissis JT, Georgiadis M, Karatzas D, Paraskevaidis J, Kroupis C, Karavolias G, Koniavitou K, Kremastinos DT.** Growth hormone administration reduces circulating proinflammatory cytokines and soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2002, 144:359-64.

**Adamopoulos S, Parissis JT, Paraskevaidis I, Karatzas D, Livanis E, Georgiadis M, Karavolias G, Mitropoulos D, Degiannis D, Kremastinos DT.** Effects of growth hormone on circulating cytokine network, and left ventricular contractile performance and geometry in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2003, 24:2186-96.

**Adams JM, Cory S.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998, 281:1322-6.

**Altomonte J, Harbaran S, Richter A, Dong H.** Fat depot-specific expression of adiponectin is impaired in Zucker fatty rats. *Metabolism.* 2003, 52:958-963.

**Amato G, Carella C, Fazio S, La Montagna G, Cittadini A, Sabatini D, Marciano-Mone C, Sacca L, Bellastella A.** Body composition, bone metabolism, and heart structure and function in growth hormone (GH)-deficient adults before and after GH replacement therapy at low doses. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, 77:1671-6.

**Anversa P, Kajstura J.** Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res.* 1998, 83:1-14.

**Anversa P, Leri A, Beltrami CA, Guerra S, Kajstura J.** Myocyte death and growth in the failing heart. *Lab Invest.* 1998, 78:767-86.

**Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Shimomura I, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation.* 2002, 105:2893-8.

**Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 257:79-83.

**Arnold RE, Weigent DA.** The inhibition of apoptosis in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone. *Neuroimmunomodulation.* 2004, 11:149-59.

**Aukrust P, Gullestad L, Ueland T, Damas JK, Yndestad A.** Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications. *Ann Med.* 2005, 37:74-85.

**Baixeras E, Jeay S, Kelly PA, Postel-Vinay MC.** The proliferative and antiapoptotic actions of growth hormone and insulin-like growth factor-1 are mediated through distinct signaling pathways in the Pro-B Ba/F3 cell line. *Endocrinology.* 2001, 142:2968-77.

**Baldini G, Hohl T, Lin HY, Lodish HF.** Cloning of a Rab3 isotype predominantly expressed in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89:5049-52.

**Ban E, Gagnerault MC, Jammes H, Postel-Vinay MC, Haour F, Dardenne M.** Specific binding sites for growth hormone in cultured mouse thymic epithelial cells. *Life Sci.* 1991, 48:2141-2148.

**Barth N, Langmann T, Scholmerich J, Schmitz G, Schaffler A.** Identification of regulatory elements in the human adipose most abundant gene transcript-1 (apM-1) promoter: role of SP1/SP3 and TNF-alpha as regulatory pathways. *Diabetologia.* 2002, 45:1425-33.

**Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless.** SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci.* 1982, 31:1133-40.

**Baumann G, Shaw MA, Amburn K.** Regulation of plasma growth hormone-binding proteins in health and disease. *Metabolism.* 1989, 38:683-9.

**Baumann G.** Growth hormone binding protein 2001. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001, 14:355-75.

**Baumann G.** Metabolism of growth hormone (GH) and different molecular forms of GH in biological fluids. *Horm Res.* 1991, 36:5-10.

**Baxter GF.** The natriuretic peptides. *Basic Res Cardiol.* 2004, 99:71-5.

**Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P.** Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001, 344:1750-7.

**Benitah JP, Vassort G.** Aldosterone upregulates Ca(2+) current in adult rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 1999, 85:1139-45.

**Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE.** The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 2001, 7:947-53.

**Berg AH, Combs TP, Scherer PE.** ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002, 13:84-9.

**Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE.** Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone.* 2004, 35:842-9.

**Beznak M.** The restoration of cardiac hypertrophy and blood pressure in hypophysectomized rats by large doses of lyophilized anterior pituitary and growth hormone. *J Physiol.* 1954, 124:54-74.

**Booz GW, Baker KM.** Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1995, 30:537-43.

**Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y.** Adiponectin-induced angiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101:2476-81.

**Buchwalow IB, Schulze W, Karczewski P, Kostic MM, Wallukat G, Morwinski R, Krause EG, Muller J, Paul M, Slezak J, Luft FC, Haller H.** Inducible nitric oxide synthase in the myocard. *Mol Cell Biochem.* 2001, 217:73-82.

**Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A.** STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2003, 197:157-68.

**Cao CM, Xia Q, Tu J, Chen M, Wu S, Wong TM.** Cardioprotection of interleukin-2 is mediated via kappa-opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004, 309:560-7.

**Caron P, Morange-Ramos I, Cogne M, Jaquet P.** Three year follow-up of acromegalic patients treated with intramuscular slow-release lanreotide. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82:18-22.

**Casanueva FF.** Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1992, 21:483-517.

**Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR.** Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 2003, 26:2442-50.

**Charron MJ, Brosius FC 3rd, Alper SL, Lodish HF.** A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989, 86:2535-9.

**Chen DB, Wang L, Wang PH.** Insulin-like growth factor I retards apoptotic signaling induced by ethanol in cardiomyocytes. *Life Sci.* 2000, 67:1683-93.

**Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ.** Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003, 278:45021-6.

**Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van-Bilsen M, O'Brien TX, Evans SM.** Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol.* 1993, 55:77-95.

**Chun TY, Bloem LJ, Pratt JH.** Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology.* 2003, 144:1712-7.

**Cittadini A, Cuocolo A, Merola B, Fazio S, Sabatini D, Nicolai E, Colao A, Longobardi S, Lombardi G, Sacca L.** Impaired cardiac performance in GH-deficient adults and its improvement after GH replacement. *Am J Physiol.* 1994, 267:E219-25.

**Cittadini A, Isgaard J, Monti MG, Casaburi C, Di Gianni A, Serpico R, Iaccarino G, Sacca L.** Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2003, 41:2154-63.

**Cittadini A, Stromer H, Katz SE, Clark R, Moses AC, Morgan JP, Douglas PS.** Differential cardiac effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the rat. A combined in vivo and in vitro evaluation. *Circulation.* 1996, 93:800-9.

**Civitaresse AE, Jenkinson CP, Richardson D, Bajaj M, Cusi K, Kashyap S, Berria R, Belfort R, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Ravussin E.** Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2004, 47:816-20.

**Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr.** HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95:2979-84.

**Clerk A, Cole SM, Cullingford TE, Harrison JG, Jormakka M, Valks DM.** Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharmacol Ther*. 2003, 97:223-61.

**Colao A, Marzullo P, Di Somma C, Lombardi G.** Growth hormone and the heart. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001, 54:137-54.

**Colao A, Vitale G, Pivonello R, Ciccarelli A, Di Somma C, Lombardi G.** The heart: an end-organ of GH action. *Eur J Endocrinol*. 2004, 151:S93-101.

**Colucci WS.** Apoptosis in the heart. *N Engl J Med*. 1996, 335:1224-6.

**Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L.** Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest*. 2001, 108:1875-81.

**Condorelli G, Morisco C, Stassi G, Notte A, Farina F, Sgaramella G, de Rienzo A, Roncarati R, Trimarco B, Lembo G.** Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation*. 1999, 99:3071-8.

**Corbetta S, Bulfamante G, Cortelazzi D, Barresi V, Cetin I, Mantovani G, Bondioni S, Beck-Peccoz P, Spada A.** Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005, 90:2397-402.

**Corpas E, Harman SM, Blackman MR.** Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev*. 1993, 14:20-39.

**Costacou T, Zgibor JC, Evans RW, Otvos J, Lopes-Virella MF, Tracy RP, Orchard TJ.** The prospective association between adiponectin and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia*. 2005, 48:41-8.

**Costoya JA, Finidori J, Moutoussamy S, Searis R, Devesa J, Arce VM.** Activation of growth hormone receptor delivers an antiapoptotic signal: evidence for a role of Akt in this pathway. *Endocrinology*. 1999, 140:5937-43.

**Cuneo RC, Salomon F, Watts GF, Hesp R, Sonksen PH.** Growth hormone treatment improves serum lipids and lipoproteins in adults with growth hormone deficiency. *Metabolism*. 1993, 42:1519-23.

**Cuneo RC, Salomon F, Wilmschurst P, Byrne C, Wiles CM, Hesp R, Sonksen PH.** Cardiovascular effects of growth hormone treatment in growth-hormone-deficient adults: stimulation of the renin-aldosterone system. *Clin Sci (Lond)*. 1991, 81:587-92.

**Das K, Lin Y, Widen E, Zhang Y, Scherer PE.** Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, 280:1120-9.

**Das UN.** Is metabolic syndrome X an inflammatory condition? *Exp Biol Med*. 2002, 227:989-997.

**Davidson SM, Morange M.** Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes. *Dev Biol.* 2000, 218:146-60.

**Davis RL, Weintraub H, Lassar AB.** Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 1987, 51:987-1000.

**de Belder AJ, Radomski MW, Why HJ, Richardson PJ, Bucknall CA, Salas E, Martin JF, Moncada S.** Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet.* 1993, 341:84-5.

**de Belder AJ, Radomski MW, Why HJ, Richardson PJ, Martin JF.** Myocardial calcium-independent nitric oxide synthase activity is present in dilated cardiomyopathy, myocarditis, and postpartum cardiomyopathy but not in ischaemic or valvar heart disease. *Br Heart J.* 1995, 74:426-30.

**de Boer H, Blok GJ, Van der Veen EA.** Clinical aspects of growth hormone deficiency in adults. *Endocr Rev.* 1995, 16:63-86.

**de Tombe PP.** Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J Biomech.* 2003, 36:721-30.

**De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, Wencker D, Condorelli G, Dorn GW 2nd, Kitsis RN, Molkentin JD.** Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ Res.* 2000, 86:255-63.

**Debard C, Laville M, Berbe V, Loizon E, Guillet C, Morio-Liondore B, Boirie Y, Vidal H.** Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* 2004, 47:917-25.

**Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM.** Induction of Adiponectin in Skeletal Muscle by Inflammatory Cytokines: in Vivo and in Vitro Studies. *Endocrinology.* 2004, 145:5589-5597.

**Diez J.** Apoptosis in cardiovascular diseases. *Rev Esp Cardiol.* 2000, 53:267-74.

**Diez JJ, Iglesias P.** The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 2003, 148:293-300.

**Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF, Lorell BH.** Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin. *Circ Res.* 1999, 84:729-34.

**Dorn GW 2nd, Robbins J, Sugden PH.** Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res.* 2003, 92:1171-5.

**D'Souza SP, Davis M, Baxter GF.** Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther.* 2004, 101:113-29.

**Duerr RL, Huang S, Miraliakbar HR, Clark R, Chien KR, Ross J Jr.** Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest.* 1995, 95:619-27.

**Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U.** Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2001, 104:342-5.

- Durocher D, Grepin C, Nemer M.** Regulation of gene expression in the endocrine heart. *Recent Prog Horm Res.* 1998, 53:7-23.
- Edens A, Talamantes F.** Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr Rev.* 1998, 19:559-82.
- Ekhterae D, Lin Z, Lundberg MS, Crow MT, Brosius FC 3rd, Nunez G.** ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells. *Circ Res.* 1999, 85:e70-7.
- Engel FB, Hauck L, Cardoso MC, Leonhardt H, Dietz R, von Harsdorf R.** A mammalian myocardial cell-free system to study cell cycle reentry in terminally differentiated cardiomyocytes. *Circ Res.* 1999, 85:294-301.
- Fantuzzi G.** Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 115:911-9.
- Fazio S, Cittadini A, Cuocolo A, Merola B, Sabatini D, Colao A, Biondi B, Lombardi G, Sacca L.** Impaired cardiac performance is a distinct feature of uncomplicated acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994, 79:441-6.
- Fazio S, Cittadini A, Sabatini D, Merola B, Colao AM, Biondi B, Lombardi G, Sacca L.** Evidence for biventricular involvement in acromegaly: a Doppler echocardiographic study. *Eur Heart J.* 1993, 14:26-33.
- Fazio S, Palmieri EA, Biondi B, Cittadini A, Sacca L.** The role of the GH-IGF-I axis in the regulation of myocardial growth: from experimental models to human evidence. *Eur J Endocrinol.* 2000, 142:211-6.
- Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, Vigorito C, Giordano A, Guida R, Pardo F, Biondi B, Sacca L.** A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1996, 334:809-14.
- Field LJ.** Atrial natriuretic factor-SV40 T antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice. *Science.* 1988, 239:1029-33.
- Flyvbjerg A, Jorgensen KD, Marshall SM, Orskov H.** Inhibitory effect of octreotide on growth hormone-induced IGF-I generation and organ growth in hypophysectomized rats. *Am J Physiol.* 1991, 260:E568-74.
- Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA.** Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation.* 2004, 109:1580-9.
- Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF.** Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98:2005-10.
- Fujimaki S, Kanda T, Fujita K, Tamura J, Kobayashi I.** The significance of measuring plasma leptin in acute myocardial infarction. *J Int Med Res.* 2001, 29:108-13.
- Garg S, Narula J, Chandrashekhar Y.** Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol.* 2005, 38:73-9.

**Geller HM, Cheng KY, Goldsmith NK, Romero AA, Zhang AL, Morris EJ, Grandison L.** Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside. *J Neurochem.* 2001, 78:265-75.

**Georgescu SP, Komuro I, Hiroi Y, Mizuno T, Kudoh S, Yamazaki T, Yazaki Y.** Downregulation of polo-like kinase correlates with loss of proliferative ability of cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1997, 29:929-37.

**Ghio S, Magrini G, Monti L.** The current therapeutic approach to chronic heart failure. *Ital Heart J.* 2003, 4:7S-14S.

**Giustina A, Boni E, Romanelli G, Grassi V, Giustina G.** Cardiopulmonary performance during exercise in acromegaly, and the effects of acute suppression of growth hormone hypersecretion with octreotide. *Am J Cardiol.* 1995, 75:1042-7.

**Goh EL, Pircher TJ, Lobie PE.** Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilizes the microtubule network and protects against colchicine-induced apoptosis. *Endocrinology.* 1998, 139:4364-72.

**Goldstein BJ, Scalia R.** Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89:2563-8.

**Gomez-Ambrosi J, Becerril S, Oroz P, Zabalza S, Rodriguez A, Muruzabal FJ, Archanco M, Gil MJ, Burrell MA, Fruhbeck G.** Reduced adipose tissue mass and hypoleptinemia in iNOS deficient mice: effect of LPS on plasma leptin and adiponectin concentrations. *FEBS Lett.* 2004, 577:351-6.

**Grimm D, Cameron D, Griese DP, Riegger GA, Kromer EP.** Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1998, 40:297-306.

**Grossman W, Jones D, McLaurin LP.** Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 1975, 56:56-64.

**Grundy SM.** Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89:2595-600.

**Gu Y, Zou Y, Aikawa R, Hayashi D, Kudoh S, Yamauchi T, Uozumi H, Zhu W, Kadowaki T, Yazaki Y, Komuro I.** Growth hormone signalling and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 2001, 223:35-46.

**Guerre-Millo M.** Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 2004, 30:13-9.

**Haefner A, Deas O, Mollereau B, Estaquier J, Mignon A, Haefner-Cavaillon N, Charpentier B, Senik A, Hirsch F.** Growth hormone prevents human monocytic cells from Fas-mediated apoptosis by up-regulating Bcl-2 expression. *Eur J Immunol.* 1999, 29:334-44.

**Haefner A, Thieblemont N, Deas O, Marelli O, Charpentier B, Senik A, Wright SD, Haefner-Cavaillon N, Hirsch F.** Inhibitory effect of growth hormone on TNF-alpha secretion and nuclear factor-kappaB translocation in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol.* 1997, 158:1310-4.

**Haffner SM.** The insulin resistance syndrome revisited. *Diabetes Care.* 1996, 19:275-277.

**Hanson MC, Fath KA, Alexander RW, Delafontaine P.** Induction of cardiac insulin-like growth factor I gene expression in pressure overload hypertrophy. *Am J Med Sci.* 1993, 306:69-74.

**Hardie DG.** Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.* 2003, 144:5179-83.

**Hattori S, Hattori Y, Kasai K.** Hypoadiponectinemia is caused by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Metabolism.* 2005, 54:482-7.

**Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K.** Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia.* 2003, 46:1543-9.

**Haunstetter A, Izumo S.** Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998, 82:1111-29.

**Haunstetter A, Izumo S.** Chapt. Apoptosis. In *Heart Physiology and Pathophysiology.* Academic Press. Fourth edition, 2001.

**Haunstetter A, Izumo S.** Toward antiapoptosis as a new treatment modality. *Circ Res.* 2000, 86:371-6.

**Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MJ, Keeling PJ, Trindade PT, Lewis NP, Byrne CD, Rickenbacher PR, Bishopric NH, Cooke JP, McKenna WJ, Fowler MB.** Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation.* 1996, 93:1087-94.

**Hjalmarson A, Isaksson O, Ahren K.** Effects of growth hormone and insulin on amino acid transport in perfused rat heart. *Am J Physiol.* 1969, 217:1795-802.

**Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 1990, 348:334-6.

**Hoffstedt J, Arvidsson E, Sjölin E, Wahlén K, Arner P.** Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89:1391-1396.

**Horseman ND, Yu-Lee LY.** Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocr Rev.* 1994, 15:627-49.

**Hoshijima M, Sah VP, Wang Y, Chien KR, Brown JH.** The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *J Biol Chem.* 1998, 273:7725-30.

**Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y.** Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000, 20:1595-9.

**Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y.** Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes.* 2001, 50:1126-33.

- Hu E, Liang P, Spiegelman BM.** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 1996, 271:10697-703.
- Hull KL, Thiagarajah A, Harvey S.** Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tissues. *Cell Tissue Res.* 1996, 286:69-80.
- Hunter JJ, Chien KR.** Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med.* 1999, 341:1276-83.
- Hussain MA.** Growth hormone for the failing heart. *Eur J Endocrinol.* 1998, 139:476-8.
- Iglesias MJ, Piñeiro R, Blanco M, Gallego R, Dieguez C, Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F.** Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2004, 62:481-8.
- Isgaard J, Nilsson A, Vikman K, Isaksson OG.** Growth hormone regulates the level of insulin-like growth factor-I mRNA in rat skeletal muscle. *J Endocrinol.* 1989, 120:107-12.
- Isgaard J, Tivesten A, Friberg P, Bengtsson BA.** The role of the GH/IGF-I axis for cardiac function and structure. *Horm Metab Res.* 1999, 31:50-4.
- Isgaard J, Wahlander H, Adams MA, Friberg P.** Increased expression of growth hormone receptor mRNA and insulin-like growth factor-I mRNA in volume-overloaded hearts. *Hypertension.* 1994, 23:884-8.
- Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T, Yoda-Murakami M, Choi-Miura NH, Tomita M, Ito K, Zhang L, Akishima Y, Ishihara M, Muramatsu M, Taniyama M.** Changes in the distribution pattern of gelatin-binding protein of 28 kDa (adiponectin) in myocardial remodelling after ischaemic injury. *Histopathology.* 2003, 42:43-52.
- Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F.** Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation.* 1993, 87:1715-21.
- Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Ouchi N, Ohishi M, Sugimoto K, Fu Y, Motone M, Yamamoto K, Matsuo A, Ohashi K, Kihara S, Funahashi T, Rakugi H, Matsuzawa Y, Ogihara T.** Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension.* 2004, 43:1318-23.
- James TN.** Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation.* 1994, 90:556-73.
- Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Baixeras E.** Growth hormone prevents apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in interleukin-3-dependent Ba/F3 cell line. *Mol Endocrinol.* 2000, 14:650-61.
- Jin H, Yang R, Lu H, Ogasawara AK, Li W, Ryan A, Peale F, Paoni NF.** Effects of early treatment with growth hormone on infarct size, survival, and cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Growth Horm IGF Res.* 2002, 12:208-15.
- Jugdutt BI.** Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2003, 3:1-30.
- Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R.** Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003, 228:1111-7.

**Kadowaki T, Yamauchi T.** Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005, 26:439-51.

**Kahaly G, Stover C, Beyer J, Mohr-Kahaly S.** Relation of endocrine and cardiac findings in acromegalics. *J Endocrinol Invest.* 1992, 15:13-8.

**Kahn BB, Flier JS.** Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000, 106:473-81.

**Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P.** Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95:8801-5.

**Kakita T, Hasegawa K, Iwai-Kanai E, Adachi S, Morimoto T, Wada H, Kawamura T, Yanazume T, Sasayama S.** Calcineurin pathway is required for endothelin-1-mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2001, 88:1239-46.

**Kamai Y, Mikawa S, Endo K, Sakai H, Komano T.** Regulation of insulin-like growth factor-I expression in mouse preadipocyte Ob1771 cells. *J Biol Chem.* 1996, 271:9883-6.

**Kang MJ, Kim JS, Chae SW, Koh KN, Koh GY.** Cyclins and cyclin dependent kinases during cardiac development. *Mol Cells.* 1997, 7:360-6.

**Kang PM, Izumo S.** Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res.* 2000, 86:1107-13.

**Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, Buridi A, Klein JB.** Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 2000, 275:13690-8.

**Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL 2nd, Billiar TR.** Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation.* 2000, 101:2742-8.

**Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H.** Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2005, 54:117-21.

**Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M.** The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev.* 1991, 12:235-51.

**Kelly PA, Finidori J, Moulin S, Kedzia C, Binart N.** Growth hormone receptor signalling and actions in bone growth. *Horm Res.* 2001, 55:14-7.

**Kershaw EE, Flier JS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89:2548-56.

**Kiess W, Gallaher B.** Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol.* 1998, 138:482-91.

**Kishore U, Reid KB.** C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology.* 2000, 49:159-70.

- Kiya T, Endo T, Henmi H, Goto T, Kitajima Y, Manase K, Takahashi S, Kudo R.** The effects of growth hormone on corpus luteum of superovulated rats. *Endocr Res.* 1999, 25:179-93.
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res.* 2004, 94:e27-31.
- Kolle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F.** Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 2002, 61:180-6.
- Komuro I, Yazaki Y.** Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* 1993, 55:55-75.
- Kopchick JJ, Andry JM.** Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab.* 2000, 71:293-314.
- Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T.** Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem.* 2002, 277:25863-6.
- Lappas M, Permezel M, Rice GE.** Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology.* 2005, 146:3334-42.
- Laser M, Willey CD, Jiang W, Cooper G 4th, Menick DR, Zile MR, Kuppuswamy D.** Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 2000, 275:35624-30.
- Lee WL, Chen JW, Ting CT, Ishiwata T, Lin SJ, Korc M, Wang PH.** Insulin-like growth factor I improves cardiovascular function and suppresses apoptosis of cardiomyocytes in dilated cardiomyopathy. *Endocrinology.* 1999, 140:4831-40.
- Leiden JM.** Beating the odds: a cardiomyocyte cell line at last. *J Clin Invest.* 1999, 103:591-2.
- Lempereur L, Brambilla D, Scoto GM, D'Alcamo M, Goffin V, Crosta L, Palmucci T, Rampello L, Bernardini R, Cantarella G.** Growth hormone protects human lymphocytes from irradiation-induced cell death. *Br J Pharmacol.* 2003, 138:1411-6.
- Li J, Hu X, Selvakumar P, Russell RR 3rd, Cushman SW, Holman GD, Young LH.** Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004, 287:E834-41.
- Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkentin JD.** Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2000, 101:2431-7.
- Lin LY, Lin CY, Su TC, Liao CS.** Angiotensin II-induced apoptosis in human endothelial cells is inhibited by adiponectin through restoration of the association between endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 90. *FEBS Lett.* 2004, 574:106-10.

- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J.** Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*. 2002, 360:57-8.
- Liu YM, Lacorte JM, Viguier N, Poitou C, Pelloux V, Guy-Grand B, Coussieu C, Langin D, Basdevant A, Clement K.** Adiponectin gene expression in subcutaneous adipose tissue of obese women in response to short term very low calorie diet and refeeding. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, 88:5881-5886.
- Lombardi G, Colao A, Marzullo P, Ferone D, Longobardi S, Esposito V, Merola B.** Is growth hormone bad for your heart? Cardiovascular impact of GH deficiency and of acromegaly. *J Endocrinol*. 1997, 155:S33-7.
- Lopaschuk GD, Collins-Nakai RL, Itoi T.** Developmental changes in energy substrate use by the heart. *Cardiovasc Res*. 1992, 26:1172-80.
- Lopez-Velasco R, Escobar-Morreale HF, Vega B, Villa E, Sancho JM, Moya-Mur JL, Garcia-Robles R.** Cardiac involvement in acromegaly: specific myocardiopathy or consequence of systemic hypertension? *J Clin Endocrinol Metab*. 1997, 82:1047-53.
- Lotem J, Kama R, Sachs L.** Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activated calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96:12016-20.
- Lu C, Schwartzbauer G, Sperling MA, Devaskar SU, Thamotharan S, Robbins PD, McTiernan CF, Liu JL, Jiang J, Frank SJ, Menon RK.** Demonstration of direct effects of growth hormone on neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2001, 276:22892-900.
- Luo Z, Shyu KG, Gualberto A, Walsh K.** Calcineurin inhibitors and cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 1998, 4:1092-3.
- Ma XL, Kumar S, Gao F, Louden CS, Lopez BL, Christopher TA, Wang C, Lee JC, Feuerstein GZ, Yue TL.** Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1999, 99:1685-91.
- MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ.** Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res*. 2000, 46:257-63.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K.** cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 1996, 221:286-9.
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002, 8:731-7.
- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y.** PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001, 50:2094-9.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S.** Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999, 103:697-705.

- Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H.** Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology*. 2004, 40:177-84.
- Mathews LS, Enberg B, Norstedt G.** Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J Biol Chem*. 1989, 264:9905-10.
- Matsubara M, Maruoka S, Katayose S.** Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002, 87:2764-9.
- Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, Kumada M, Okamoto Y, Nagaretani H, Nishizawa H, Kishida K, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Nagai R, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem*. 2002, 277:37487-91.
- Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T.** Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci*. 1999, 892:146-54.
- Matsuzawa Y.** Adipocytokines and metabolic syndrome. *Semin Vasc Med*. 2005, 5:34-9.
- Maulik N, Engelman RM, Wei Z, Lu D, Rousou JA, Das DK.** Interleukin-1 alpha preconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation*. 1993, 88:II387-94.
- Mayoux E, Ventura-Clapier R, Timsit J, Behar-Cohen F, Hoffmann C, Mercadier JJ.** Mechanical properties of rat cardiac skinned fibers are altered by chronic growth hormone hypersecretion. *Circ Res*. 1993, 72:57-64.
- McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP.** Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation*. 2002, 105:2712-8.
- Meguro T, Hong C, Asai K, Takagi G, McKinsey TA, Olson EN, Vatner SF.** Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circ Res*. 1999, 84:735-40.
- Melmed S.** Acromegaly. *N Engl J Med*. 1990, 322:966-77.
- Merola B, Cittadini A, Colao A, Longobardi S, Fazio S, Sabatini D, Sacca L, Lombardi G.** Cardiac structural and functional abnormalities in adult patients with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993, 77:1658-61.
- Mitsunaka H, Dobashi H, Sato M, Tanaka T, Kitanaka A, Yamaoka G, Tokuda M, Matoba K, Hiraishi T, Ishida T.** Growth hormone prevents Fas-induced apoptosis in lymphocytes through modulation of Bcl-2 and caspase-3. *Neuroimmunomodulation*. 2001, 9:256-62.
- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN.** A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998, 93:215-28.
- Molkentin JD.** Calcineurin, mitochondrial membrane potential, and cardiomyocyte apoptosis. *Circ Res*. 2001, 88:1220-2.

**Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Habara-Ohkubo A, Nakaoka T, Fujita T, Yazaki Y, Komuro I.** Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol.* 1999, 19:7096-105.

**Morikawa M, Nixon T, Green H.** Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell.* 1982, 29:783-789.

**Morvan D, Komajda M, Grimaldi A, Turpin G, Grosogeat Y.** Cardiac hypertrophy and function in asymptomatic acromegaly. *Eur Heart J.* 1991, 12:666-72.

**Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ.** Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 315:264-71.

**Muller EE, Locatelli V, Cocchi D.** Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev.* 1999, 79:511-607.

**Muller P, Beltrami AP, Cesselli D, Pfeiffer P, Kazakov A, Bohm M.** Myocardial regeneration by endogenous adult progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005, 39:377-87.

**Munson PJ, Rodbard D.** Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem.* 1980, 107:220-39.

**Mylonas PG, Matsouka PT, Papandoniou EV, Vagianos C, Kalfarentzos F, Alexandrides TK.** Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2000, 160:115-22.

**Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P.** Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 2003, 92:139-50.

**Nadal-Ginard B.** Generation of new cardiomyocytes in the adult heart: Prospects of myocardial regeneration as an alternative to cardiac transplantation. *Rev Esp Cardiol.* 2001, 54:543-50.

**Nagaya N, Kangawa K.** Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure. *Regul Pept.* 2003, 114:71-7.

**Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M.** Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo).* 1996, 120:803-12.

Nickola MW, Wold LE, Colligan PB, Wang GJ, Samson WK, Ren J. Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes. Role of NO. *Hypertension.* 2000, 36:501-5.

**Nilsson BO.** Biological effects of aminoguanidine: An update. *Inflamm Res.* 1999, 48:509-515.

**Nyberg F, Burman P.** Growth hormone and its receptors in the central nervous system--location and functional significance. *Horm Res.* 1996, 45:18-22.

**Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Nagaretani H, Kumada M, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Hiraoka H, Iwashima Y, Ishikawa K, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H, Ogihara T,**

- Matsuzawa Y.** Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2004, 43:1195-200.
- Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, Muraguchi M, Ouchi N, Takahashi M, Igura T, Inui Y, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Miyagawa J, Funahashi T, Matsuzawa Y.** An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res.* 2000, 32:47-50.
- Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2002, 106:2767-70.
- Olson EN, Klein WH.** bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* 1994, 8:1-8.
- Onay-Besikci A, Altarejos JY, Lopaschuk GD.** gAd-globular head domain of adiponectin increases fatty acid oxidation in newborn rabbit hearts. *J Biol Chem.* 2004, 279:44320-6.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation.* 1999, 100:2473-6.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 2001, 103:1057-63.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation.* 2000, 102:1296-301.
- Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N, Kobayashi H, Hiraoka H, Matsuzawa Y.** Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation.* 2003, 107:671-4.
- Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K.** Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004, 279:1304-9.
- Pajak L, Jin F, Xiao GH, Soonpaa MH, Field LJ, Yeung RS.** Sustained cardiomyocyte DNA synthesis in whole embryo cultures lacking the TSC2 gene product. *Am J Physiol.* 1997, 273:H1619-27
- Paulus WJ.** Cytokines and heart failure. *Heart Fail Monit.* 2000, 1:50-6.
- Pelletier A, Joly E, Prentki M, Coderre L.** AMPK and p38 MAPK Participate in the Stimulation of Glucose Uptake by Dinitrophenol in Adult Cardiomyocytes. *Endocrinology.* 2005, 146:2285-94.

- Penney DG, Dunbar JC Jr, Baylerian MS.** Cardiomegaly and haemodynamics in rats with a transplantable growth hormone-secreting tumour. *Cardiovasc Res.* 1985, 19:270-7.
- Pennisi PA, Kopchick JJ, Thorgeirsson S, LeRoith D, Yakar S.** Role of growth hormone (GH) in liver regeneration. *Endocrinology.* 2004, 145:4748-55.
- Perreault M, Marette A.** Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med.* 2001, 7:1138-43.
- Perrot A, Ranke MB, Dietz R, Osterziel KJ.** Growth hormone treatment in dilated cardiomyopathy. *J Card Surg.* 2001, 16:127-31.
- Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB.** Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA.* 2004, 291:1730-7.
- Poon BY, Raharjo E, Patel KD, Tavener S, Kubes P.** Complexity of inducible nitric oxide synthase: cellular source determines benefit versus toxicity. *Circulation.* 2003, 108:1107-12.
- Pulkki KJ.** Cytokines and cardiomyocyte death. *Ann Med.* 1997, 29:339-43.
- Rademaker MT, Cameron VA, Charles CJ, Lainchbury JG, Nicholls MG, Richards AM.** Adrenomedullin and heart failure. *Regul Pept.* 2003, 112:51-60.
- Rajala MW, Scherer PE.** Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology.* 2003, 144:3765-73.
- Rakatzi I, Mueller H, Ritzeler O, Tennagels N, Eckel J.** Adiponectin counteracts cytokine- and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetologia.* 2004, 47:249-58.
- Rapaport R, Sills IN, Green L, Barrett P, Labus J, Skuza KA, Chartoff A, Goode L, Stene M, Petersen BH.** Detection of human growth hormone receptors on IM-9 cells and peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry: Correlation with growth hormone-binding protein levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995, 80:2612-2619.
- Reilly MP, Rader DJ.** The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation.* 2003, 108:1546-51.
- Ren J.** Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol.* 2004, 181:1-10.
- Roberts R.** Chapt. Principles of Molecular Cardiology. Part I: Basic Foundations of Cardiology. In *Hurt's the heart.* McGraw Hill. 2000.
- Robinson LE, Graham TE.** Metabolic syndrome, a cardiovascular disease risk factor: role of adipocytokines and impact of diet and physical activity. *Can J Appl Physiol.* 2004, 29:808-29.
- Rosenblatt-Velin N, Lerch R, Papageorgiou I, Montessuit C.** Insulin resistance in adult cardiomyocytes undergoing dedifferentiation: role of GLUT4 expression and translocation. *FASEB J.* 2004, 18:872-4.
- Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993, 362:801-9.

- Russell RR 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ, Young LH.** AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest.* 2004, 114:495-503.
- Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I.** Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J.* 2003, 375:1-16.
- Sacca L, Cittadini A, Fazio S.** Growth hormone and the heart. *Endocr Rev.* 1994, 15:555-73.
- Sah VP, Hoshijima M, Chien KR, Brown JH.** Rho is required for Galphaq and alpha1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. *J Biol Chem.* 1996, 271:31185-90.
- Saito K, Tobe T, Minoshima S, Asakawa S, Sumiya J, Yoda M, Nakano Y, Shimizu N, Tomita M.** Organization of the gene for gelatin-binding protein (GBP28). *Gene.* 1999, 229:67-73.
- Saito S, Hiroi Y, Zou Y, Aikawa R, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I.** beta-Adrenergic pathway induces apoptosis through calcineurin activation in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2000, 275:34528-33.
- Salvatori R.** Growth hormone and IGF-1. *Rev Endocr Metab Disord.* 2004, 5:15-23.
- Samson WK.** Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 1999, 61:363-89.
- Sanders EJ, Harvey S.** Growth hormone as an early embryonic growth and differentiation factor. *Anat Embryol (Berl).* 2004, 209:1-9.
- Santos RL, Silva CM, Ribeiro AF, Vasconcelos AC, Pesquero JL, Coelho SG, Serakides R, Reis SR.** Effect of growth hormone and induced IGF-I release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. *Theriogenology.* 1999, 51:975-84.
- Sarkar D, Vallance P, Harding SE.** Nitric oxide: not just a negative inotrope. *Eur J Heart Fail.* 2001, 3:527-34.
- Sasayama S, Ross J Jr, Franklin D, Bloor CM, Bishop S, Dilley RB.** Adaptations of the left ventricle to chronic pressure overload. *Circ Res.* 1976, 38:172-8.
- Savage DD, Henry WL, Eastman RC, Borer JS, Gorden P.** Echocardiographic assessment of cardiac anatomy and function in acromegalic patients. *Am J Med.* 1979, 67:823-9.
- Schäffler A, Orso E, Palitzsch KD, Buchler C, Drobnik W, Furst A, Scholmerich J, Schmitz G.** The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia (FCH). *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 260:416-25.
- Scheepens A, Sirimanne ES, Breier BH, Clark RG, Gluckman PD, Williams CE.** Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience.* 2001, 104:677-87.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF.** A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995, 270:26746-9.

- Schulze PC, Kratzsch J, Linke A, Schoene N, Adams V, Gielen S, Erbs S, Moebius-Winkler S, Schuler G.** Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2003, 5:33-40.
- Segard HB, Moulin S, Boumard S, Augier de Cremiers C, Kelly PA, Finidori J.** Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts. *Cell Signal.* 2003, 15:615-23.
- Shahi M, Beshyah SA, Hackett D, Sharp PS, Johnston DG, Foale RA.** Myocardial dysfunction in treated adult hypopituitarism: a possible explanation for increased cardiovascular mortality. *Br Heart J.* 1992, 67:92-6.
- Shahrara S, Drvota V, Blange I, Torma H, Sylven C.** Characterization of AT-1 cardiomyocytes as a model for studies of T3 effects on cardiac cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, 237:303-6.
- Shapiro L, Scherer PE.** The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol.* 1998, 8:335-8.
- Sharma V, McNeill JH.** The emerging roles of leptin and ghrelin in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005, 3:169-80.
- Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel DR, Kumada M, Sato K, Schiekofer S, Ohashi K, Funahashi T, Colucci WS, Walsh K.** Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med.* 2004a, 10:1384-9.
- Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T, Walsh K.** Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* 2004b, 279:28670-4.
- Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K.** Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med.* 2005 (doi: 10.1038/nm1295).
- Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, Oshiro Y, Takasu N, Tagawa T, Ueda S, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88:3236-40.
- Shimada K, Miyazaki T, Daida H.** Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta.* 2004, 344:1-12.
- Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, Zou Y, Oka T, Uozumi H, Kudoh S, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I.** Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation.* 1999, 100:2449-54.
- Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, Jee YH, Kim J, Bae SR, Chang YP.** Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett.* 2004, 354:64-8.
- Shulman GI.** Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000, 106:171-6.
- Siiteri PK.** Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr.* 1987, 45:277-82.

- Silverman BL, Friedlander JR.** Is growth hormone good for the heart? *J Pediatr.* 1997, 131:S70-4.
- Sirotkin AV, Makarevich AV.** GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. *J Endocrinol.* 1999, 163:317-27.
- Sowers JR.** Obesity as a cardiovascular risk factor. *Am J Med.* 2003, 115:37S-41S.
- Stadheim TA, Saluta GR, Kucera GL.** Role of c-Jun N-terminal kinase/p38 stress signaling in 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2000, 59:407-18.
- Staiger H, Kausch C, Guirguis A, Weisser M, Maerker E, Stumvoll M, Lammers R, Machicao F, Haring HU.** Induction of adiponectin gene expression in human myotubes by an adiponectin-containing HEK293 cell culture supernatant. *Diabetologia.* 2003, 46:956-60.
- Steinmetz M, Quentin T, Poppe A, Paul T, Jux C.** Changes in expression levels of genes involved in fatty acid metabolism: upregulation of all three members of the PPAR family (alpha, gamma, delta) and the newly described adiponectin receptor 2, but not adiponectin receptor 1 during neonatal cardiac development of the rat. *Basic Res Cardiol.* 2005, 100:263-9.
- Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkentin JD.** Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97:1196-201.
- Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, Shimomura I, Hotta K, Kuriyama H, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000, 24:861-868.
- Takahashi T, Fukuda K, Pan J, Kodama H, Sano M, Makino S, Kato T, Manabe T, Ogawa S.** Characterization of insulin-like growth factor-1-induced activation of the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 1999, 85:884-91.
- Tan GD, Debard C, Funahashi T, Humphreys SM, Matsuzawa Y, Frayn KN, Karpe F, Vidal H.** Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy. *Diabetologia.* 2005, 48:1585-9.
- Tan KC, Xu A, Chow WS, Lam MC, Ai VH, Tam SC, Lam KS.** Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89:765-9.
- Tanno M, Gorog DA, Bellahcene M, Cao X, Quinlan RA, Marber MS.** Tumor necrosis factor-induced protection of the murine heart is independent of p38-MAPK activation. *J Mol Cell Cardiol.* 2003, 35:1523-7.
- Taylor JM, Rovin JD, Parsons JT.** A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2000, 275:19250-7.
- Teruel T, Valverde AM, Alvarez A, Benito M, Lorenzo M.** Differentiation of rat brown adipocytes during late foetal development: role of insulin-like growth factor I. *Biochem J.* 1995, 310:771-6.
- Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995, 267:1456-62.

- Timsit J, Riou B, Bertherat J, Wisnewsky C, Kato NS, Weisberg AS, Lubetzki J, Lecarpentier Y, Winegrad S, Mercadier JJ.** Effects of chronic growth hormone hypersecretion on intrinsic contractility, energetics, isomyosin pattern, and myosin adenosine triphosphatase activity of rat left ventricle. *J Clin Invest.* 1990, 86:507-15.
- Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB.** Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99:16309-13.
- Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz W Jr, Hanks SK, Franchini KG.** Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2003, 93:140-7.
- Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF.** Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem.* 2002, 277:29359-62.
- Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, Heuser JE, Lodish HF.** Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signalling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem.* 2003, 278:50810-7.
- Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T.** Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem.* 2004, 279:30817-22.
- Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, Kuwasako K, Imamura T, Koiwaya Y, Tsuji T, Kangawa K, Eto T.** Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. *Hypertension.* 1998, 31:505-10.
- Van Der Lee KA, Willemsen PH, Van Der Vusse GJ, Van Bilsen M.** Effects of fatty acids on uncoupling protein-2 expression in the rat heart. *FASEB J.* 2000, 14:495-502.
- VanWinkle WB, Snuggs MB, Buja LM.** Cardiogel: a biosynthetic extracellular matrix for cardiomyocyte culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1996, 32:478-85.
- Vaux DL, Strasser A.** The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93:2239-44.
- Viengchareun S, Zennaro MC, Le Tallec LP, Lombes M.** Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. *FEBS Lett.* 2002, 532:345-350.
- Volterrani M, Desenzani P, Lorusso R, d'Aloia A, Manelli F, Giustina A.** Haemodynamic effects of intravenous growth hormone in congestive heart failure. *Lancet.* 1997, 349:1067-8.
- Volterrani M, Manelli F, Ciccoira M, Lorusso R, Giustina A.** Role of growth hormone in chronic heart failure. Therapeutic implications. *Drugs.* 2000, 60:711-9.
- Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T.** Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 2003, 278:40352-63.

- Walsh RA.** Chapt. Molecular and cellular biology of the normal, hypertrophied, and failing heart. Part I: Basic Foundations of Cardiology. In *Hurt's the heart*. McGraw Hill. 2000.
- Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ.** Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science*. 1995, 269:1108-12.
- Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J Jr, Brown JH, Han J, Chien KR.** Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*. 1998, 273:2161-8.
- Wang Y, Lam KS, Xu JY, Lu G, Xu LY, Cooper GJ, Xu A.** Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization dependent manner. *J Biol Chem*. 2005, 280:18341-7.
- Weber KT, Brilla CG.** Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991, 83:1849-65.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA.** Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001, 86:1930-5.
- White PC.** Aldosterone: direct effects on and production by the heart. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, 88:2376-83.
- White SM, Constantin PE, Claycomb WC.** Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004, 286:H823-9.
- Winder WW, Hardie DG.** AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol*. 1999, 277:E1-10.
- Winzell MS, Nogueiras R, Diéguez C, Ahren B.** Dual action of adiponectin on insulin secretion in insulin-resistant mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 321:154-160.
- Woods RL.** Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004, 31:791-4.
- Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ.** Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes*. 2003, 52:1355-63.
- Xi W, Satoh H, Kase H, Suzuki K, Hattori Y.** Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation of the PI3-Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: vasorelaxation in response to globular adiponectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, 332:200-5.
- Xu XP, Best PM.** Decreased transient outward K<sup>+</sup> current in ventricular myocytes from acromegalic rats. *Am J Physiol*. 1991, 260:H935-42.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T.** Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003a, 423:762-9.

**Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T.** Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002, 8:1288-95.

**Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T.** Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2003b, 278:2461-8.

**Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T.** The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 2001, 7:941-6.

**Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM.** Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86:3815-9.

**Yoda-Murakami M, Taniguchi M, Takahashi K, Kawamata S, Saito K, Choi-Miura NH, Tomita M.** Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 285:372-7.

**Yokota T, Meka CS, Kouro T, Medina KL, Igarashi H, Takahashi M, Oritani K, Funahashi T, Tomiyama Y, Matsuzawa Y, Kincade PW.** Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. *J Immunol.* 2003, 171:5091-9.

**Yokota T, Meka CS, Medina KL, Igarashi H, Comp PC, Takahashi M, Nishida M, Oritani K, Miyagawa J, Funahashi T, Tomiyama Y, Matsuzawa Y, Kincade PW.** Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest.* 2002, 109:1303-10.

**Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y.** Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood.* 2000, 96:1723-32.

**Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW.** C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999, 19:972-978.

**Zechner D, Craig R, Hanford DS, McDonough PM, Sabbadini RA, Glembotski CC.** MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem.* 1998, 273:8232-9.

**Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994, 372:425-32.

**Zhu T, Goh EL, Graichen R, Ling L, Lobie PE.** Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal.* 2001, 13:599-616.

**Zhu T, Goh EL, Lobie PE.** Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation and association of p125 focal adhesion kinase (FAK) with JAK2. Fak is not required for stat-mediated transcription. *J Biol Chem.* 1998, 273:10682-9.

**Zhu W, Zou Y, Aikawa R, Harada K, Kudoh S, Uozumi H, Hayashi D, Gu Y, Yamazaki T, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I.** MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation.* 1999, 100:2100-7.

**Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I.** Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 2000, 275:15239-45.

