



Universitat Autònoma de Barcelona

FACULTAD DE VETERINARIA

**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL
Y TERAPIA GÉNICA (CBATEG)**

**EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN MÚSCULO
ESQUELÉTICO Y SUS EFECTOS EN LA
RESISTENCIA A INSULINA Y LA OBESIDAD**

ANTONIO HIDALGO BARRERA

Memoria presentada por el licenciado ANTONIO HIDALGO BARRERA para optar al grado de Doctor en Bioquímica.

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

ANTONIO HIDALGO BARRERA

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

PEDRO JOSÉ OTAEGUI GOYA

Enero de 2006

BELLATERRA

En el prado junto al río, debajo de un árbol,
un niño y una niña se encontraron.
- ¿Que podemos hacer?- preguntó él.
-Jugar a ser felices. Ven, yo te enseñaré. Es muy fácil.-
Y desde entonces nunca se soltaron de la mano.

AGRADECIMIENTOS

De la misma manera que el resto de apartados de la Tesis Doctoral, las páginas de agradecimientos son el resultado del día a día durante varios años en el laboratorio.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Fàtima Bosch la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral en su grupo de investigación bajo su dirección y el haberme contratado durante el tiempo necesario para la finalización de esta Tesis Doctoral.

Igualmente quisiera mostrar mi agradecimiento al Dr. Pedro José Otaegui por su contribución en la supervisión de mi trabajo de investigación.

Doy las gracias de una manera muy especial al pronto Dr. Sergio Muñoz por la ayuda indispensable en todo momento y por haber crecido un poco juntos. También por su amistad, su cariño y su compañerismo que, sin duda, ha de durar muchos años (disculpa, pero se me acabó la tinta dorada para poner tu nombre como te prometí y en la Escuela de Doctorado no me dejaron dedicarte un capítulo de la Tesis, ¡y mira que les expliqué y les insistí!). Un abrazo y suerte, amigo.

Agradezco a Albert Ruzo su disponibilidad a echarme siempre una mano. Por los buenos momentos en el laboratorio y por la inolvidable “La saeta” de Serrat improvisada en el estabulario. Gracias y ánimo. Al también pronto Dr. Miquel García, por las risas y los buenos momentos. Por explicarme en los comienzos. Por las discusiones sobre “metabolismo muscular” y “genética molecular”. Por tus opiniones. Gracias y suerte, compañero.

A Carles Roca, de todo corazón, por haber sido un compañero de poyata ideal y un amigo. Por tus bromas y mis bromas. Por tu jersey y gusto con la ropa (moda “perro cabreado”) sólo comparables a tus gustos musicales. Por los cambios de ritmo 3/4/2´6prima/8bis/4 de Dream Theater. Gracias, compañero. *Halloween for ever.*

A Judith Agudo por su apoyo y sinceridad. Por su amistad durante todo este tiempo y por su manera de reír. Por abrirle la puerta al lobo. Por su complicidad. Suerte, amiga.

A Joel Montané, por su ayuda, por su tranquilidad perenne y por haberme iniciado en el mundo de las caminatas de resistencia, las ampollas tamaño pie, las agujetas destructivas y el dolor articular paralizante. Muchas gracias, amigo, es maravilloso.

Al pre-Dr. Eduard Ayuso por los espectaculares e inolvidables “grandi momenti”. Por las cervezas en La Vila y las confesiones. Por tu apoyo y amistad en momentos complicados.

A Tura Ferre y a Sylvie Franckhauser por ayudarme en los comienzos y por haber compartido conmigo buenos momentos...y mucho más. Que tengáis siempre mucha suerte y el corazón como el bolsillo, lleno.

A Marta Moya, la mujer que más “cortes” me ha dado, por su trabajo y su sonrisa. A Mireia Zaguirre por su ayuda con los animales y su inquietud por aprender cosas. A Verónica Jiménez mi agradecimiento por su ayuda y mi solidaridad con todas las mujeres objeto. Gracias por ser como eres y por tu pro-vocación científica. A Marisa por su amistad sincera. ¡Marisa!, no hay prisa. Mucha suerte, guapa. A la Dra. Alba Casellas, la mujer que peor me cae del laboratorio, por su ayuda y sus conocimientos. Por cuidar a Ariana. Por compartir los otros dos tercios de su familia conmigo. Un abrazo, Raf. Un petonet, Joanet. A Xavier Martínez por su sinceridad y honestidad. Por plantear preguntas que abren debates interesantes. En fin, por su inquietud científica...respecto al sexo y las relaciones con las mujeres. A Virginia, por hacerme redescubrir la música durante la escritura de esta Tesis. Siempre nos quedará París. A Pilar por ser tan simpática y lozana. A Gloria por ser tan buena cocinera y tan generosa. A Àlex Mas, por la tranquilidad, paciencia y sosiego que transmite, ¿pillas la coña? A María Molas por su trabajo y por ser tan buena gente. A Ivet por ser tan generosa y compartir su hucha con nosotros. Molta sort, maca. A Efrén por su ayuda en los comienzos y por su optimismo. A Carles Ros, Anna Vilalta y Jennifer por su apoyo técnico y su amistad. Al equipo de la UAT: Anna Pujol, Anna Arbòs y Ainara por su trabajo y buen humor. Al personal del estabulario de la UAB: Matías, Juanjo, Paqui y compañía por contribuir a que todo estuviese en orden, a punto y bien clarito facilitándome el trabajo. A las nuevas incorporaciones: David Callejas, Albert Ribera y Lidia, ánimo y suerte. Al Dr. Chris Mann por ser tan normal y no ir por ahí dando saltitos, abrazándose a los árboles y mordiendo a la gente. *Rock n´Roll McDonalds!!*

Al Dr. Néstor Gómez, hermano de nicotina y humo. Gracias por tu conversación relajada, por las risas, por ser sincero y auténtico y por tu punto de vista. Yo lo dejé ¿y tú?

Al Dr. Miguel Chillón por su sentido del humor y por su ayuda. A María Ontiveros por dejarse subir los colores. A Don Dr. José Piedra por su sencilla, que no simple, visión del mundo y a la Dra. Susana Miravet por su amistad. A los dos por estar cerca... y por Josete. A Mercè, Assumpció, Estel, Ester, Lorena y compañía por su ayuda y amistad. A los del pasillo de bioquímica: Iván, Ernesto, Raquel, Amparo, María, Loli, Asier, Martí, Antonio, Clelia, Montse, Laia, Dani y compañía por su amistad, compañerismo y las conversaciones de gran trascendencia durante la comida.

Al Dr. Joaquín Ariño, a la Dra. Anna Bassols y a la Dra. Anna Barceló por su ayuda y trato cordial. A todo el personal de administración: Rosa, Montse, Espe, Esther, Lluís, Teresa, Sara...por su contribución al buen funcionamiento del Departamento de Bioquímica de Veterinaria y del CBATEG. Gracias también al personal de seguridad de la UAB.

A mis padres, por haberme dado de alta en este mundo y por haber hecho todo lo que estaba en su mano para hacerme feliz y que siempre saliese adelante. Por seguir cerca. A mi hermano y a mi hermana, por todas las cosas que hemos compartido y las muchas que nos quedan por hacer juntos. A mi sobrina Naila.

A Ariana, porque la amo y la admiro y, porque cada día que pasa, la amo y la admiro más. Porque es una gran compañera, una trabajadora infatigable y porque sabe estar en todo momento. Porque me hace reír. Porque nunca nos soltamos de la mano. T'estimo. Gràcies. A l'Agustí i la Marta per fer-me sentir un més i pel seu recolzament al tram final de la Tesis. Gràcies.

A los compañeros y amigos de gimnasio: Salvador, Orlando, Chimo, Óscar, Jose Carlos, Miguel, Cristian, Jorge, Jordis... a todos, por hacerme todo el trabajo más llevadero. A Cesar y Eva. A Juanmi. A Ana, por que su estela me llevó hasta aquí. Al Nolla y la Eli, a Nerea, al Fre y la Lore, a Julián, por estar juntos desde que, casi, empieza a olvidar mi memoria. A los del barrio, por recordarme de donde vengo. Gracias.

Este trabajo ha sido posible gracias, en primer lugar, a la beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya de la que he sido beneficiario durante cuatro años. Las investigaciones han sido financiadas por el Plan Nacional I+D (SAF2002-20389), Instituto de Salud Carlos III (Red Grupos Diabetes Mellitus G03/212 y Red Centros Metabolismo y Nutrición C03/08), la Comunidad Europea (FP6 EUGENE2, LSHM-CT-2004-512013) y la *Association Française contre les Myopathies* de Francia. Gracias al Dr. Ronald Khan (Joslin Diabetes Center, and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) por los animales IRS-1^{-/-}. Gracias al Dr. Norikazu Maeda de la Universidad de Osaka por la secuencia completa del cDNA de la adiponectina humana.

ABREVIATURAS

18S	Subunidad ribosómica 18S
2-DG	2-deoxiglucosa
μCi	Microcurio
AAV-1	Virus adenoasociados de tipo 1
ACC	Acetil-CoA-carboxilasa
flAdpn	Adiponectina completa (" <i>full-length</i> ") formada por la secuencia íntegra de la proteína (dominio colágeno y globular)
gAdpn	Adiponectina a la que se le ha eliminado el dominio colágeno y sólo se encuentra el globular
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP (" <i>AMP-activated protein kinase</i> ")
aprox	Aproximadamente
BAT	Tejido adiposo marrón (" <i>brown adipose tissue</i> ")
BMI	Índice de masa corporal: peso (Kg)/ altura ² (m)
BSA	Albúmina bovina sérica (" <i>Bovine serum albumin</i> ")
Ca²⁺	Iones calcio
cm	Centímetros
CMV	Promotor del citomegalovirus
CPT-1	Carnitina palmitoil transferasa-1
C_t	Número de ciclo en que se produce el incremento significativo de la fluorescencia en PCR a tiempo real (" <i>threshold cycle</i> ")
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
cDNA	DNA complementario sintetizado utilizando RNA como molde
dNTP	Desoxirribonucleótido
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (" <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ")

FATP-1	Proteína transportadora de ácidos grasos-1 (<i>"Fatty Acid Transport Protein-1"</i>)
g	Gramos
G-6-Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
GK	Glucoquinasa
Glucosa-6-P	Glucosa-6-fosfato
h	Horas
HFD	Dieta alta en lípidos (<i>"high-fat diet"</i>)
HMW	Unión de 12-18 monómeros de adiponectina con un peso molecular mayor de 400 kDa (<i>"high molecular weight"</i>)
Hz	Hertzios
IGF	Factor de crecimiento similar a insulina (<i>"insulin-like growth factor"</i>)
IR	Receptor de la insulina
IRSs	Sustratos del receptor de la insulina
IRS-1	Sustrato del receptor de la insulina-1
IRS-2	Sustrato del receptor de la insulina-2
Kb	Kilobases
Kg	Kilogramos
LB	Medio Luria-Bertrani
LMW	Unión de monómeros de adiponectina formando hexámeros de 180 kDa (<i>"low molecular weight"</i>)
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligramos
Mg²⁺	Iones magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
MLC	Cadena ligera de la miosina (<i>"myosin light chain"</i>)
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
nm	Nanómetros
oligo-dT	Oligo deoxitimina
ORF	Marco abierto de lectura (<i>"open reading frame"</i>)

PBS	Tampón fosfato salino (“ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“ <i>polimerase chain reaction</i> ”)
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PI3-K	Fosfatidil inositol-3 quinasa
PKB	Proteína quinasa B
PPARα	Receptor alfa activador de la proliferación de los peroxisomas (“ <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i> ”)
PPARγ	Receptor gamma activador de la proliferación de los peroxisomas (“ <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> ”)
RIA	Radioinmunoensayo
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
S.E.	Error estándar (“ <i>standard error</i> ”)
SSC	Citrato sódico salino
SV40	Virus simio 40
TAE	Tampón tris-acetato-EDTA
Taq	DNA polimerasa utilizada en PCR
TZDs	Tiazoladinedionas
UI	Unidades de insulina
V	Voltios
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
vol	Volumen
vs	Comparado con (“ <i>versus</i> ”)
WAT	Tejido adiposo blanco (“ <i>white adipose tissue</i> ”)
xg	Número de veces la fuerza de la gravedad

ÍNDICE

I. PRESENTACIÓN.....	1-2
II. INTRODUCCIÓN.....	3-35
1. EL TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO ENDOCRINO.....	3
2. ADIPONECTINA.....	7
2.1. Estructura.....	9
2.2. Receptores de adiponectina.....	12
2.3. Mecanismo de acción de la adiponectina.....	13
2.4. Adiponectina y obesidad.....	17
2.5. Adiponectina y distribución de la grasa corporal.....	19
2.6. Adiponectina y lipodistrofia.....	20
2.7. Adiponectina y resistencia a la insulina.....	20
2.8. Adiponectina y aterosclerosis.....	22
3. DIABETES TIPO 2	
3.1. Definición.....	25
3.2. Patogénesis.....	26
4. MODELOS ANIMALES DE DIABETES TIPO 2.....	29
4.1. Modelos espontáneos.....	29
4.2. Modelos inducidos experimentalmente.....	30
4.2.1. <i>Dieta alta en lípidos</i>	31
4.3. Ratones genosuprimidos (<i>knock-out</i>).....	31
4.3.1. <i>Ratones genosuprimidos IRS-1^{-/-}</i>	33
III. OBJETIVOS.....	36-37
IV. RESULTADOS.....	38-94
PARTE I: EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO EN LA RESISTENCIA A INSULINA Y LA OBESIDAD	
Introducción.....	38
1. ESTUDIO EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO	
1.1. Obtención de ratones transgénicos que expresan adiponectina en músculo esquelético.....	39
1.1.1. <i>Construcción del gen quimérico MLC/Adpn</i>	39

1.1.2. <i>Generación de ratones transgénicos</i>	41
1.1.3. <i>Análisis de la expresión de adiponectina en músculo esquelético</i>	43
1.1.4. <i>Análisis de la presencia de la proteína adiponectina</i>	44
1.2. Estudio de los efectos de la expresión de adiponectina en músculo esquelético en condiciones estándar de alimentación.....	47
1.2.1. <i>Análisis de la glucemia y la insulinemia</i>	47
1.2.2. <i>Test de tolerancia a la insulina</i>	48
1.2.3. <i>Test de tolerancia a la glucosa</i>	49
1.2.4. <i>Captación basal de glucosa</i>	50
1.2.5. <i>Peso corporal e ingesta de alimento</i>	51
1.2.6. <i>Contenido de grasa corporal</i>	52
1.2.7. <i>Análisis de la leptinemia</i>	53
1.2.8. <i>Determinación de triglicéridos en músculo</i>	54
1.2.9. <i>Test de tolerancia a ácidos grasos</i>	55
1.2.10. <i>Determinación de glucógeno y lactato muscular</i>	56
1.2.11. <i>Determinación del estado de activación de AMPK</i>	57
1.2.12. <i>Determinación del estado de activación del enzima ACC</i>	58
1.2.13. <i>Expresión de CPT-1 en músculo esquelético</i>	59
1.3. Estudio de los efectos de una dieta alta en lípidos en animales transgénicos que expresan adiponectina en músculo esquelético.....	60
1.3.1. <i>Evolución del peso corporal e ingesta de alimento</i>	60
1.3.2. <i>Análisis de la glucemia y la insulinemia</i>	61
1.3.3. <i>Análisis de la leptinemia</i>	62
1.3.4. <i>Test de tolerancia a la insulina</i>	63
1.3.5. <i>Test de tolerancia a la glucosa</i>	64
1.3.6. <i>Niveles circulantes de adiponectina</i>	65
2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO MEDIANTE TRANSDUCCIÓN CON AAV-1	66
2.1. <i>Producción de AAV-1 con el gen quimérico CMV/Adpn</i>	66
2.2. <i>Análisis “in vitro” de la expresión de adiponectina mediante AAV-1</i>	67
2.3. <i>Expresión de adiponectina en músculo mediante AAV-1</i>	68
2.4. <i>Evolución del peso corporal</i>	70
2.5. <i>Análisis de la glucemia y la insulinemia</i>	71
2.6. <i>Test de tolerancia a la insulina</i>	72
PARTE II: EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO EN UN MODELO DE RESISTENCIA A INSULINA SIN OBESIDAD	
Introducción.....	74
3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES DEFICIENTES EN IRS-1	
3.1. <i>Construcción del vector para electrotransferencia</i>	75
3.2. <i>Expresión de adiponectina en músculo esquelético mediante electrotransferencia</i>	76

3.3. Detección de la proteína adiponectina.....	77
3.4. Análisis de la glucemia y la insulinemia.....	78
3.5. Test de tolerancia a la insulina.....	80
3.6. Test de tolerancia a la glucosa.....	82
3.7. Captación de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo.....	83
3.8. Almacenamiento y utilización de la glucosa en músculo esquelético.....	85
3.9. Efecto de la expresión de adiponectina en los niveles de fosforilación de IRS-2.....	86
3.10. Efecto de la adiponectina en la asociación estimulada por insulina de p85 con IRS-2.....	87
3.11. Efecto sobre la fosforilación de Akt.....	88
3.12. Determinación del estado de activación de AMPK.....	89
3.13. Determinación del estado de activación de ACC.....	90
3.14. Expresión génica en músculo esquelético.....	91
V. DISCUSIÓN.....	95-111
VI. CONCLUSIONES.....	112-114
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	115-150
1. MATERIALES	
1.1. Animales.....	115
1.2. Obtención de los ratones transgénicos y establecimiento de las líneas.....	116
1.3. Cepas bacterianas y vectores plasmídicos.....	116
1.4. Sondas de DNA.....	118
1.5. Anticuerpos.....	119
2. MÉTODOS	
2.1. Obtención y análisis de DNA.	
2.1.1. <i>Preparación DNA plasmídico.....</i>	119
2.1.2. <i>Digestión enzimática del DNA.....</i>	120
2.1.3. <i>Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.</i>	
2.1.3.1. <i>Geles de agarosa.....</i>	121
2.1.3.2. <i>Purificación de los fragmentos de DNA.....</i>	122
2.1.3.3. <i>Defosforilación de vectores.....</i>	122
2.1.4. <i>Construcción de moléculas híbridas de DNA.....</i>	122
2.1.4.1. <i>Subclonaje de los fragmentos de DNA.....</i>	123
2.1.4.2. <i>Transformación de las células de E. coli.....</i>	123
2.1.5. <i>Clonación de Acrp30.....</i>	124
2.1.6. <i>Marcaje radiactivo de las sondas de DNA.....</i>	125
2.2. Detección de los animales transgénicos.	
2.2.1. <i>Obtención de DNA genómico.....</i>	125

2.2.2. <i>Análisis de DNA mediante Southern blot.</i>	
2.2.2.1. <i>Digestión y electroforesis de DNA genómico.....</i>	126
2.2.2.2. <i>Transferencia de DNA a membrana.....</i>	127
2.2.2.3. <i>Hibridación de la membrana.....</i>	128
2.2.2.4. <i>Lavados de la membrana y revelado.....</i>	128
2.2.3. <i>Análisis de DNA mediante PCR.....</i>	129
2.3. <i>Preparación y análisis de RNA.</i>	
2.3.1. <i>Extracción de RNA total.....</i>	130
2.3.2. <i>Electroforesis de RNA.....</i>	131
2.3.3. <i>Análisis de RNA mediante Northern blot.....</i>	131
2.4. <i>Preparación y análisis de proteínas.</i>	
2.4.1. <i>Extracción de proteínas totales.....</i>	132
2.4.2. <i>Inmunoprecipitación.....</i>	133
2.4.3. <i>Determinación de la concentración de proteínas.....</i>	134
2.4.4. <i>Análisis de las proteínas mediante Western blot.</i>	
2.4.4.1. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-page).....</i>	135
2.4.4.2. <i>Transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección... </i>	135
2.5. <i>Dieta alta en lípidos.....</i>	136
2.6. <i>Determinación de la ingesta.....</i>	137
2.7. <i>Test de tolerancia a la glucosa.....</i>	137
2.8. <i>Test de tolerancia a la insulina.....</i>	138
2.9. <i>Test de tolerancia a ácidos grasos.....</i>	138
2.10. <i>Determinación del índice de utilización de la glucosa in vivo.....</i>	138
2.11. <i>Determinación del contenido de grasa corporal.....</i>	140
2.12. <i>Determinación glucógeno, glucosa-6-fosfato y lactato musculares.....</i>	140
2.12.1. <i>Determinación del contenido de glucógeno.....</i>	141
2.12.2. <i>Determinación del contenido de glucosa-6-fosfato y lactato.....</i>	142
2.13. <i>Determinación del contenido de triglicéridos musculares.....</i>	142
2.14. <i>PCR a tiempo real.....</i>	143
2.15. <i>Determinación de parámetros séricos.....</i>	145
2.15.1. <i>Glucosa sanguínea.....</i>	146
2.15.2. <i>Triglicéridos.....</i>	146
2.15.3. <i>Insulina.....</i>	146
2.15.4. <i>Leptina.....</i>	147
2.15.5. <i>Adiponectina.....</i>	147
2.16. <i>Inmunohistoquímica en células.....</i>	148
2.17. <i>Administración de virus adenoasociados AAV-1.....</i>	148
2.18. <i>Electrotransferencia de DNA a músculo esquelético.....</i>	149
2.19. <i>Análisis estadísticos.....</i>	150

I. PRESENTACIÓN

La adiponectina es una adipoquina cuyos mecanismos de actuación no se conocen todavía con exactitud. Niveles plasmáticos bajos de adiponectina se han correlacionado con la obesidad (Hu et al., 1996; Arita et al., 1999) y con la resistencia a insulina y la hiperinsulinemia (Weyer et al., 2001; Kern et al., 2003), incluso en individuos no obesos (Abbasi et al., 2004). La adiponectina promueve la sensibilidad a insulina y protege de la obesidad y, por tanto, se ha sugerido que podría ser utilizada para mejorar la sensibilidad a insulina en pacientes diabéticos y obesos (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). El incremento de la oxidación de lípidos en músculo esquelético mediado por la adiponectina se ha considerado como uno de los principales factores que conduce a la mejora en la señalización y la sensibilidad a insulina a nivel sistémico (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001; Yamauchi et al., 2002). Estos datos sugerían que la expresión constitutiva de adiponectina en músculo esquelético y sus efectos en este tejido podrían proteger de la resistencia a insulina y la obesidad inducida por una dieta alta en lípidos.

En la primera parte del presente estudio, se analizaron los efectos de la expresión de adiponectina en músculo esquelético en la sensibilidad a insulina y la obesidad. Con este fin, se generaron ratones transgénicos que expresaban adiponectina localmente en músculo esquelético. Estos animales se alimentaron con una dieta alta en lípidos. De la misma manera, se expresó adiponectina en músculo esquelético en ratones mediante la utilización de vectores virales. Posteriormente, estos animales también se alimentaron con dieta alta en lípidos para valorar el efecto de la expresión de adiponectina en la sensibilidad a insulina y la obesidad.

Se observó que la adiponectina actuaba a nivel local en el músculo esquelético aumentando la sensibilidad a insulina en condiciones estándar de alimentación a la vez que inducía una mayor predisposición a oxidar ácidos grasos en este tejido. Sin embargo, este efecto de la adiponectina exclusivamente en músculo esquelético no era suficiente para contrarrestar la resistencia a insulina inducida por una dieta alta en lípidos.

La segunda parte del presente estudio se centró en analizar los efectos de la expresión de adiponectina en músculo en un modelo de resistencia primaria a la insulina. En este caso, la resistencia a insulina no era debida a la lipotoxicidad inducida por la ingesta de dieta alta en lípidos sino a un defecto en la señalización de insulina. Para ello, se utilizaron animales genosuprimidos IRS-1^{-/-}. En primer lugar, los animales IRS-1^{-/-} presentan resistencia severa a insulina y alteración en la tolerancia a la glucosa pero no presentan obesidad. En segundo lugar, este modelo no presenta resistencia a la insulina en hígado, ya que IRS-2 compensa funcionalmente en este tejido la falta de IRS-1 (Yamauchi et al., 1996; Previs et al., 2000). Además, la utilización de este modelo permitió estudiar si los efectos de la adiponectina como sensibilizador de la insulina tenían lugar independientemente de la presencia de IRS-1, el principal sustrato del receptor de la insulina en músculo esquelético.

Tras la electrotransferencia del gen de la adiponectina en músculo esquelético de ratones IRS-1^{-/-} se observó que la expresión de adiponectina mejoraba la sensibilidad a insulina. Ello era debido a una normalización en el metabolismo de la glucosa y no a un aumento en la oxidación de ácidos grasos en estos animales.

II. INTRODUCCIÓN

1. EL TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO ENDOCRINO.

Clásicamente el tejido adiposo ha sido concebido como un tejido almacén de energía debido a su gran capacidad de captar ácidos grasos libres del torrente circulatorio y acumularlos en forma de triglicéridos. Los estudios de este tejido se han centrado en determinar su relación con el metabolismo y almacenamiento de ácidos grasos, el desarrollo del propio tejido y su respuesta a señales endocrinas y neurales.

No obstante, ya desde los años 40, se hipotetizaba sobre la existencia de una comunicación entre el tejido adiposo y otros tejidos. Durante la última década se han identificado diferentes proteínas secretadas por los adipocitos que actúan sobre otros tejidos. La clonación y descripción del gen de la leptina (Zhang et al., 1994) supuso el mayor impulso en el estudio del tejido adiposo como parte activa y reguladora del metabolismo.

Actualmente, se conoce que el tejido adiposo secreta un gran número de péptidos bioactivos y proteínas conocidas en conjunto con el nombre de adipoquinas. Estos factores secretados por el tejido adiposo tienen un papel central en el control de la homeostasis ya que intervienen en la regulación de procesos fisiológicos tales como la ingesta de alimento, el balance energético, la acción de la insulina, el metabolismo lipídico y glucídico, la angiogénesis y el remodelado vascular y la presión sanguínea y la coagulación.

Como glándula secretora, el tejido adiposo presenta diferentes características poco usuales. En primer lugar, a pesar de ser un tejido localizado lo podemos encontrar en todo el organismo formando depósitos locales que no están físicamente interconectados. Se desconoce como se coordina a nivel nervioso o humoral la secreción entre estos diferentes depósitos. En segundo lugar, el tejido adiposo está formado por diferentes tipos celulares que incluyen adipocitos maduros, preadipocitos, fibroblastos y macrófagos. Todos ellos contribuyen, en mayor o menor grado, a la función secretora del tejido adiposo. En tercer lugar, la capacidad secretora del tejido adiposo varía según si su localización es visceral o subcutánea. De esta manera, algunos depósitos de grasa contribuyen más activamente que otros a la producción de adipoquinas específicas (Fried et al., 1998; Dusserre et al., 2000). En cuarto lugar, algunas de las adipoquinas son secretadas también por otros tejidos diferentes al adiposo, resultando complicado determinar la contribución específica del tejido adiposo a los niveles circulantes totales de estos factores. Por último, todavía se desconocen los mecanismos implicados en la biosíntesis y exocitosis de las adipoquinas, aunque hay evidencias de la existencia de vías de secreción reguladas y constitutivas en la célula adiposa (Mora and Pessin, 2002).

Es conocido que el tejido adiposo incrementa en la obesidad y disminuye en síndromes lipoatróficos. La cantidad de triglicéridos almacenados en las células del tejido adiposo es uno de los principales indicadores del peso del tejido adiposo. Por tanto, los niveles de producción de una adipoquina específica podrían estar alterados como consecuencia de la alteración del peso del tejido adiposo. Sin embargo, esta relación no es clara en la mayoría de los casos. La obesidad y la lipoatrofia son estados patológicos asociados con problemas metabólicos tales

como la hiperlipidemia, la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, además de estar relacionadas con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. A partir de estas asociaciones, resulta probable que la alteración de las adipoquinas en estos estados patológicos sea la responsable de la aparición de las complicaciones secundarias características de estas patologías.

La lista de adipoquinas descritas ha ido creciendo en los últimos años y existen indicios de que la lista será aún mayor. Algunas de las adipoquinas, tales como el angiotensinógeno y el inhibidor 1 del activador del plasminógeno (*plasminogen activator inhibitor 1*, PAI-1), están implicadas en la homeóstasis vascular. Otras adipoquinas como la adiposina, la proteína estimuladora de la acilación (*acylation-stimulating protein*, ASP), el factor alfa de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor α* , TNF- α), la interleuquina-6 (IL-6) y la resistina están asociados con la aparición y mantenimiento de la resistencia a insulina. Por el contrario, adipoquinas como la leptina y la adiponectina están asociadas a una mayor sensibilidad a insulina. Recientemente ha sido descrita la visfatina, una hormona secretada en el tejido adiposo que es capaz de unirse al receptor de la insulina y estimular la señalización de esta vía (Fukuhara et al., 2005; Hug and Lodish, 2005).

Así pues, esta red de adipoquinas en que se interrelacionan con ellas mismas y con otras moléculas son de vital importancia para el diálogo que se establece entre los diferentes tejidos como el músculo, el hígado y el tejido adiposo (Figura 1). Una de las adipoquinas más interesante es la adiponectina, una proteína cuya relevancia fisiológica y sus mecanismos de actuación están todavía por esclarecer y que es motivo de estudio en la presente Tesis Doctoral.

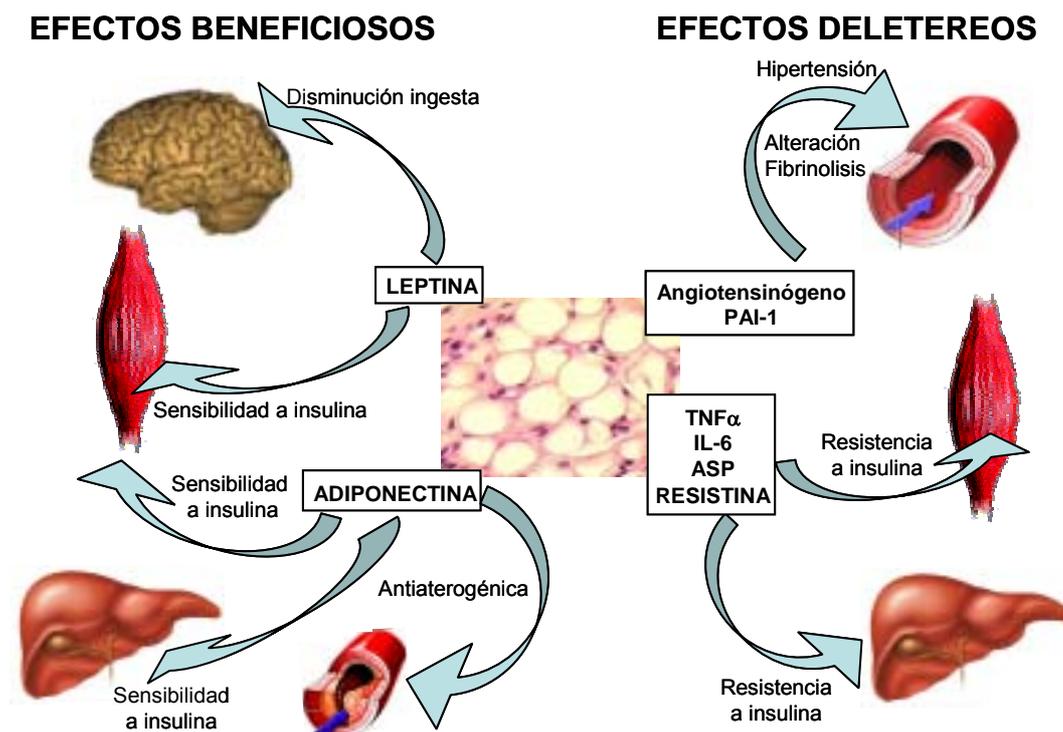


Figura 1. Factores secretados por el tejido adiposo implicados en la homeóstasis energética, sensibilidad a insulina y la homeóstasis vascular. En individuos obesos hay una producción excesiva de ASP, TNF α , IL-6 y resistina, los cuales disminuyen la acción de la insulina en hígado y músculo esquelético. A nivel vascular, el angiotensinógeno y PAI-1 favorecen la hipertensión y la alteración de la fibrinólisis. En cambio, la adiponectina protege de la formación de ateromas. La leptina, sensibiliza a la insulina y regula el balance energético disminuyendo la ingesta. En individuos obesos, la leptina esta incrementada pero presentan resistencia a esta hormona. La adiponectina estimula la sensibilidad a insulina a nivel periférico y esta disminuida en la obesidad.

2. ADIPONECTINA.

La adiponectina fue clonada y descrita durante los años 1995 y 1996 por cuatro grupos independientes utilizando técnicas diferentes. Así pues, podemos encontrar que esta proteína se le denomina con diferentes nombres en la bibliografía, siendo el más utilizado el de adiponectina. El primer grupo en publicar sus resultados fue el dirigido por Philip Scherer en el año 95, en el que aislaron el cDNA de ratón utilizando la técnica de hibridación sustractiva a partir de RNA expresado durante la diferenciación a adipocito de los fibroblastos 3T3-L1 (Scherer et al., 1995). A la proteína que codificaba se le dio el nombre de Acrp30 (*Adipocyte complement-related protein of 30 kDa*) debido a la homología del dominio globular del C-terminal con el del factor del complemento C1q. El extremo N-terminal de esta proteína estaba formado por un dominio colágeno rico en repeticiones Gly-X-Pro. Además, era una proteína que se expresaba específicamente en el tejido adiposo y que se podía encontrar en el suero en concentraciones de 5-40 µg/mL, representando hasta el 0.05% de las proteínas séricas. En el siguiente trabajo, en el año 1996, se describió la secuencia del cDNA y la estructura de la adiponectina humana a partir de técnicas de secuenciación masiva de librerías de cDNA (Maeda et al., 1996). En este caso, la proteína se denominó apM1 (*Adipose Most Abundant Gene Transcript 1*) y se observó que compartía gran homología estructural y de secuencia con la proteína murina. Igual que en caso anterior, era una proteína específica de tejido adiposo y se encontraba de forma abundante en sangre. En este mismo año, se describió un gen de ratón específico de adiposo y cuya expresión estaba disminuida en ratones y humanos obesos (Hu et al., 1996). En este caso, la adiponectina fue llamada adipoQ. También en 1996, la adiponectina fue purificada del plasma humano mediante técnicas de cromatografía de afinidad y posteriormente

secuenciada. Se la denominó GBP28 y era completamente homologa a la proteína apM1 publicada con anterioridad (Nakano et al., 1996).

Desde su primera descripción, la adiponectina está siendo redescubierta por los expertos y es, actualmente, una de la adipoquinas más estudiada (Figura 2A). Esto es debido a su posible papel como nexo de unión de la obesidad, la resistencia a la insulina y los problemas vasculares (Figura 2B).

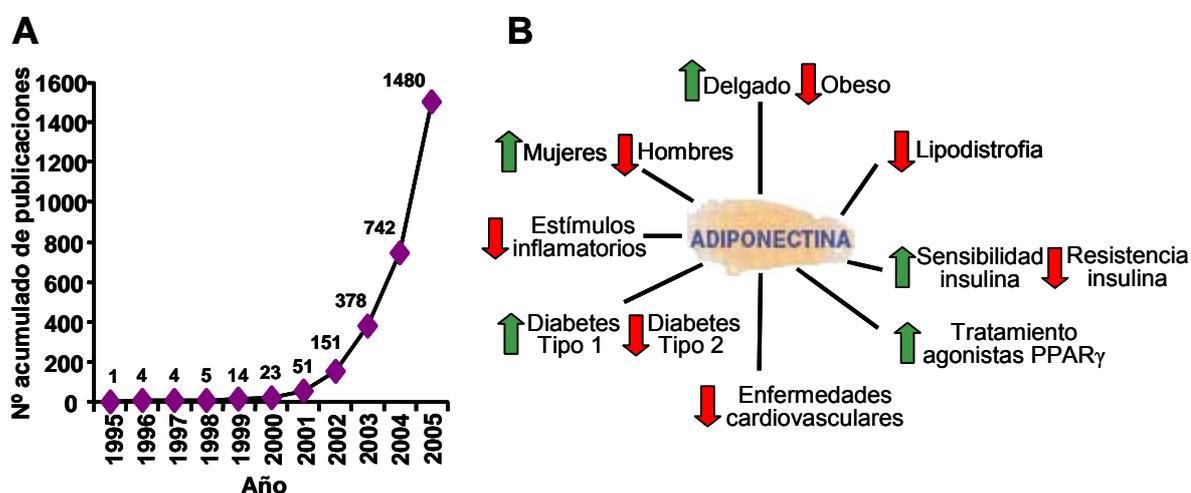


Figura 2. A) Citaciones a adiponectina. Número acumulado de publicaciones. Se representa el número de publicaciones que citaban a la adiponectina en un año determinado desde que se descubrió en el año 1995, según la base de datos de PubMed (www.pubmed.gov). **B) Factores o estados patológicos que afectan a los niveles adiponectina.** Resumen de las diferentes condiciones o enfermedades que están asociadas a niveles altos (flecha verde) o niveles bajos (flecha roja) de adiponectina. Esquema adaptado de (Trujillo and Scherer, 2005).

2.1. Estructura.

La adiponectina humana se encuentra codificada por el gen apM1 en el cromosoma 3, en el locus 3q27 (Takahashi et al., 2000). Este locus se ha relacionado con susceptibilidad para padecer diabetes (Vionnet et al., 2000). Ocupa aproximadamente 17 Kb y está formado por 3 exones y 2 intrones. La adiponectina humana tiene una secuencia de 247 aminoácidos y un peso molecular de 30 kDa. El transcrito derivado de este gen es específico de tejido adiposo y es el que se encuentra en mayor cantidad en este tejido (Maeda et al., 1996). La adiponectina pertenece a una superfamilia de proteínas solubles que comparten homología con los colágenos VIII y X y el factor del complemento C1q. En esta familia también se incluyen la precerebelina y la hibernina Hib27, proteína presente en el suero de roedores hibernadores cuando estos están activos.

En la estructura de la adiponectina hay 4 dominios. En el extremo amino terminal encontramos la secuencia señal, que permite la secreción de la adiponectina, seguida de una región sin homología, un dominio colágeno y en el extremo carboxi terminal, un dominio globular (Scherer et al., 1995). La estructura cristalizada del extremo globular de la adiponectina presenta similitud estructural con el TNF α (Shapiro and Scherer, 1998). Forma un homotrímero con una topología característica y en la que el extremo N-terminal se encuentra próximo al C-terminal. Análisis funcionales demuestran que la adiponectina recombinante sintetizada en bacterias es menos potente que la sintetizada a partir de células de mamífero. Esto puede ser debido a las diferentes modificaciones post-traduccionales por las que pasa la adiponectina. Estas modificaciones post-traduccionales incluyen la O-glicosidación con ácido disialico (Sato et al., 2001) y la hidroxilación y la

glucosilación de cuatro residuos lisina conservados en la región amino terminal formada por el dominio colágeno (Wang et al., 2002). Cuando estos residuos de lisina son sustituidos por arginina disminuyen los efectos de la adiponectina (Wang et al., 2002), proponiéndose la hidroxilación y la glucosilación como un mecanismo de regulación de la adiponectina. Aunque el papel de la hidroxilación y la glucosilación a nivel de regulación aún no es claro parece ser que tienen una función estabilizadora del dominio de colágeno.

Los monómeros de adiponectina forman homotrímeros y estructuras más complejas formadas por la unión de estos trímeros mediante puentes disulfuro. Estas estructuras más complejas incluyen las de bajo peso molecular (LMW) formadas por hexámeros de 180 kDa, y de alto peso molecular (HMW) formado por 12-18meros con un peso molecular mayor de 400 kDa (Figura 3). Además, se ha aislado *in vitro* el dominio globular mediante digestión con proteasas. Este dominio globular fue el primero en utilizarse en aproximaciones terapéuticas (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). La existencia fisiológica de este dominio globular no es clara ya que, excepto en una publicación (Fruebis et al., 2001), nadie ha conseguido detectarlo ni en humanos ni en modelos animales. Se ha demostrado *in vitro*, que una línea celular monocítica puede secretar una elastasa capaz de aislar el dominio globular (Waki et al., 2005) pero se desconoce su relevancia fisiológica. Los adipocitos pueden secretar LMW y HMW de la adiponectina, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas formas son las predominantes en suero, mientras que complejos más pequeños como los trímeros se encuentran muy poco representados. Estas oligomerizaciones influyen directamente en la acción de la adiponectina (Tsao et al., 2002). Estudios con formas mutantes recombinantes de la adiponectina, que sólo pueden generar la

forma trimérica, demuestran que el trímero es la forma que posee mayor actividad biológica (Pajvani et al., 2003). Estos resultados sugieren que los complejos LMW y HMW pueden actuar como precursores de la forma trimérica. Ambos complejos podrían ser reducidos a trímeros tras la actuación de una hipotética reductasa presente en suero o en la membrana de las células diana.

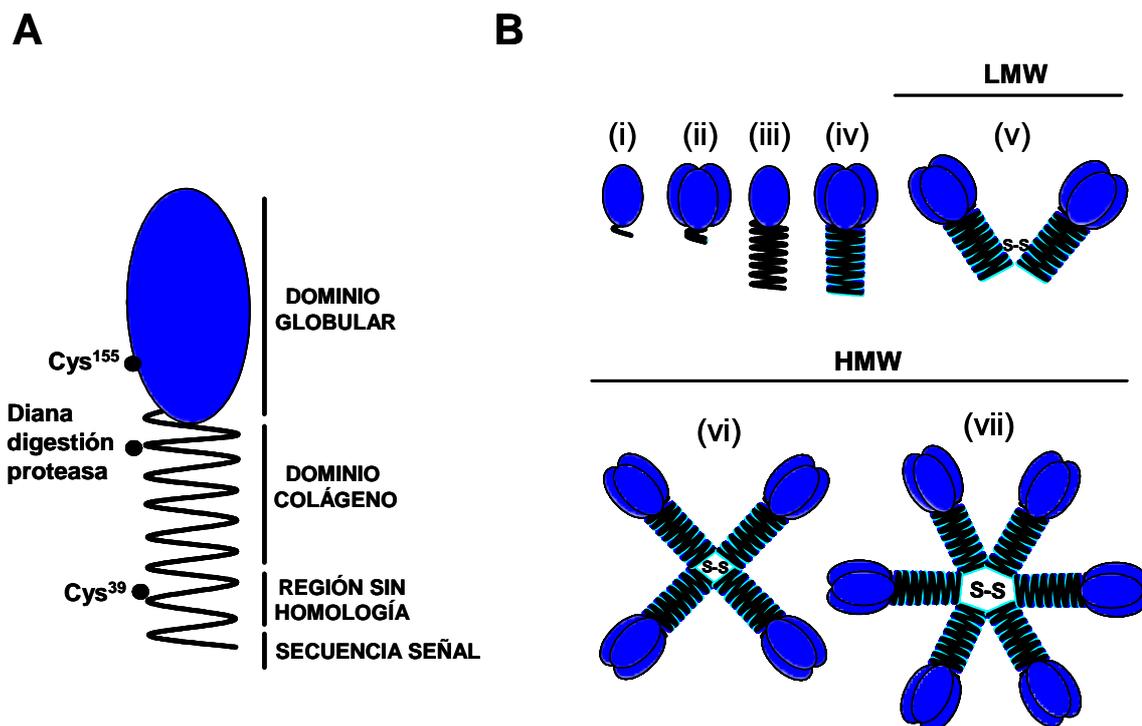


Figura 3. Estructura del monómero y de los homocomplejos de adiponectina.

A) Representación esquemática del monómero de adiponectina con el dominio globular en el extremo C-terminal y la secuencia señal en el extremo N-terminal. Se indica la ubicación de los aminoácidos con los que forma los puentes disulfuro y el lugar de actuación de la proteasa.

B) (i) monómero y (ii) homotrímero globulares obtenidos *in vitro* mediante digestión con proteasa, (iii) monómero completo, (iv) homotrímero, (v) hexámero o supracomplejo de bajo peso molecular (LMW). Los supracomplejos de alto peso molecular (HMW) están formados por complejos de doce (vi) y dieciocho (vii) monómeros.

2.2. Receptores de adiponectina.

Recientemente, se han descrito dos isoformas diferentes de receptores para la adiponectina (Yamauchi et al., 2003a). Estos receptores se denominan AdipoR1 y AdipoR2 y tienen siete dominios transmembrana aunque estructuralmente no tienen ninguna relación con los receptores acoplados a proteína G. En ratón, estos receptores se expresan de manera ubicua, siendo AdipoR1 mayoritario en el músculo esquelético y AdipoR2 mayoritario en el hígado. La forma globular de la adiponectina se une más eficientemente a AdipoR1 y la forma completa a AdipoR2. En cambio, estudios recientes en humanos indican que estas diferencias de expresión entre receptores no existen en músculo esquelético (Civitarese et al., 2004). En humanos, se ha descrito que la rosiglitazona, un compuesto perteneciente a la familia de las tiazoladinedionas (TZDs) utilizado para el tratamiento de la diabetes tipo 2, aumenta la expresión de AdipoR1 en tejido adiposo pero la disminuye en músculo esquelético. Este hecho indica que este receptor, podría mediar los efectos específicos de tejido de estos fármacos en relación con la sensibilización a la insulina (Tan et al., 2005). Además, se ha descrito una asociación entre los diferentes polimorfismos de los receptores de la adiponectina y la susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 2 (Wang et al., 2004; Damcott et al., 2005). También se ha descrito la expresión de ambos receptores en las células β pancreáticas, en cantidades similares al hígado y superiores al músculo (Kharroubi et al., 2003). Estos trabajos sugieren la existencia de una interacción entre el músculo y la célula β a través de la adiponectina. La naturaleza molecular de este nexo de unión está todavía por clarificar. Además, la relevancia *in vivo* de la regulación de los receptores de la adiponectina está todavía por esclarecer. Por último, se ha demostrado que la

adiponectina completa sintetizada en bacterias en forma de LMW y HMW puede unirse a T-caderina (Hug et al., 2004), aunque todavía no se han demostrado sus implicaciones funcionales.

2.3. Mecanismo de acción de la adiponectina.

Los mecanismos mediante los cuales la adiponectina puede ejercer sus efectos en los diferentes tejidos no están claros. Tampoco se conoce la contribución relativa de cada tejido a los efectos sistémicos ejercidos por esta proteína. La adiponectina puede regular la fosforilación del receptor de la insulina (Stefan et al., 2002) y regular su actividad tirosina quinasa (Yamauchi et al., 2001), paso inicial esencial en la cascada de señalización de la insulina. El ratón genosuprimido para el gen de la adiponectina, alimentado con dieta alta en lípidos y en carbohidratos, presenta una mayor resistencia a insulina y una menor fosforilación del sustrato del receptor de la insulina -1 (IRS-1) asociado con un descenso en la actividad de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3-K) (Maeda et al., 2002). Así pues, la adiponectina puede interaccionar directamente con la señalización de la insulina, mediante mecanismos que se desconocen, afectando a su capacidad de acción.

El mecanismo mediante el cual la adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina parece estar relacionado principalmente con el incremento en la oxidación de ácidos grasos mediante la activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) y el aumento de la expresión de PPAR α en músculo esquelético e hígado (Figuras 4 y 5) (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2002; Yamauchi et al., 2003a). La administración de adiponectina completa (flAdpn), formada por los dominios colágeno y dominio globular, o únicamente del dominio globular (gAdpn) en ratones

incrementa la fosforilación de AMPK en músculo esquelético. En hígado, esta activación se observa exclusivamente con la IAdpn . La activación de la AMPK por adiponectina parece ser la responsable de la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa y la producción de lactato en el músculo esquelético. En hígado, esta activación promueve la fosforilación de ACC y una reducción en la expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y de glucosa-6- fosfatasa (G-6-Pasa) (Combs et al., 2002; Yamauchi et al., 2002).

MÚSCULO ESQUELÉTICO

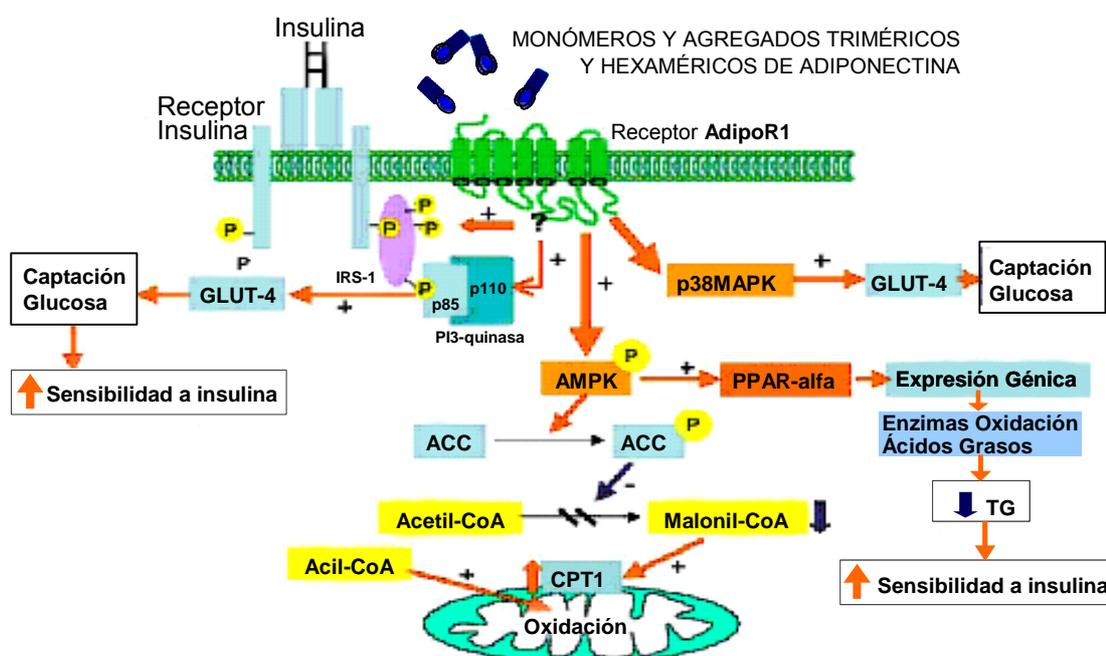


Figura 4. Modelo de acción de la adiponectina en músculo esquelético. ACC: Acetil-CoA Carboxilasa; AMPK: quinasa dependiente de AMP; CPT1: Carnitina palmitoil transferasa; GLUT-4: transportador de glucosa-4; IRS-1: sustrato del receptor de la insulina- 1; PI3-quinasa: fosfatidil inositol 3-quinasa, formada por las subunidades p85 y p110; p38MAPK: quinasa p38 activada por mitógeno; PPAR-alfa: receptor alfa activador de la proliferación de los peroxisomas; TG: triglicéridos. Esquema adaptado de (Gil-Campos et al., 2004).

HEPATOCITOS

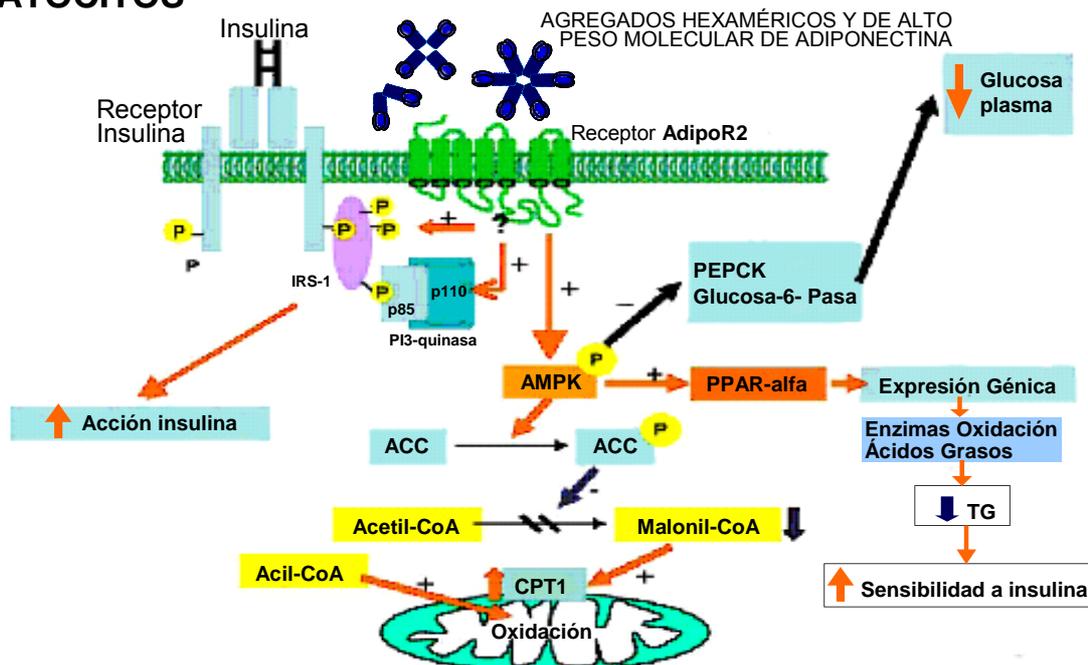


Figura 5. Modelo de acción de la adiponectina en hígado. ACC: Acetil-CoA Carboxilasa; AMPK: quinasa dependiente de AMP; CPT1: Carnitina palmitoil transferasa; Glucosa-6-Pasa: Glucosa-6-fosfatasa; GLUT-4: transportador de glucosa-4; IRS-1: sustrato del receptor de la insulina- 1; PI3-quinasa: fosfatidil inositol 3-quinasa, formada por las subunidades p85 y p110; p38MAPK: quinasa p38 activada por mitógeno; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; PPAR-alfa: receptor alfa activador de la proliferación de los peroxisomas; TG: triglicéridos. Esquema adaptado de (Gil-Campos et al., 2004).

Se han realizado varios estudios de la administración de adiponectina exógena en modelos murinos, tanto *in vivo* como *in vitro*. El dominio globular se obtiene *in vitro* a partir de la digestión con tripsina de adiponectina recombinante producida en bacterias y constituyó la primera aproximación para el estudio de su función terapéutica (Fruebis et al., 2001). Varios grupos describen que tanto la administración a ratones de μ Adpn como la administración de γ Adpn, ambos producidos en bacterias, produce una disminución en los niveles circulantes de glucosa, ácidos grasos y triglicéridos (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). Estos efectos han sido atribuidos, *in vitro*, al incremento en la captación de glucosa y a la oxidación de ácidos grasos en las células musculares mediante la activación

de AMPK (Tomas et al., 2002;Yamauchi et al., 2002). El descenso en los ácidos grasos circulantes debido al incremento en músculo de la oxidación de lípidos se ha postulado como el principal factor que conduce a la mejora en la señalización de la insulina y la sensibilidad a la hormona a nivel sistémico (Yamauchi et al., 2001;Yamauchi et al., 2002).

Los efectos de la administración de adiponectina exógena observados en músculo parecen ser mayores con la μ Adpn que con la η Adpn. Esto puede ser debido a que, estructuralmente, la forma globular de la adiponectina carece del dominio colágeno imprescindible para la multimerización y ello favorece la interacción con su diana (Shapiro and Scherer, 1998). Además, parece ser que los efectos en músculo de la η Adpn producida en bacterias son mayores que cuando es sintetizada en células de mamífero. Debido a las diferencias en el procesamiento y maduración de las proteínas entre los sistemas de expresión en bacterias y los sistemas de mamíferos, la η Adpn sintetizada en bacterias es secretada principalmente como formas de bajo peso molecular. Esto es debido a que las bacterias no permiten un plegamiento correcto de la proteína y no se da una orientación válida que permita la formación de puentes disulfuro entre los dominios de colágeno.

A diferencia del músculo, parece ser que la multimerización de la adiponectina es necesaria para su bioactividad en el hígado. Así pues, no queda claro si los efectos observados en músculo esquelético son farmacológicos o si son un reflejo de alguna función fisiológica de la adiponectina. Algunos estudios, con adiponectina sintetizada en células de mamíferos, sugieren que es el hígado y no el músculo el principal órgano donde la adiponectina ejerce su actividad (Berg et al., 2001). En un

sistema de expresión de origen mamífero, la μ Adpn es secretada en forma de LMW y HMW. La administración de la adiponectina así generada a ratones normales o diabéticos y obesos conduce a un descenso en la glucosa circulante (Berg et al., 2001). El efecto de la adiponectina en el hígado requiere previamente la hidroxilación y glucosilación en el dominio colágeno (Wang et al., 2002). Ello podría explicar porqué en los estudios que han utilizado la γ Adpn, sin el dominio colágeno, o bien la μ Adpn sintetizada en bacterias, y que carece por tanto de modificaciones post-traduccionales, no afectan a la producción hepática de glucosa o a la sensibilidad a la insulina en este tejido. Este efecto sería dependiente de la presencia de la adiponectina en forma compleja (LMW y HMW). Una visión en conjunto de los trabajos realizados hasta la fecha sugiere que los efectos observados de la adiponectina en los diferentes tejidos no serían debido a la concentración total de las formas LMW y HMW sino a la proporción entre ambos complejos (Pajvani et al., 2004).

2.4. Adiponectina y obesidad.

Dado que la adiponectina es sintetizada exclusivamente por los adipocitos, se podría esperar que cambios en la masa de tejido adiposo corporal puedan producir cambios en la cantidad de adiponectina circulante. Sin embargo, y a diferencia de otras hormonas sintetizadas en el adiposo, la cantidad de adiponectina sérica y su expresión está paradójicamente disminuida en condiciones de obesidad (Hu et al., 1996; Arita et al., 1999). Además, esta relación inversa entre la concentración de adiponectina circulante y la grasa corporal se observa también en individuos con baja o casi nula grasa corporal, como las personas con anorexia nerviosa, que muestran niveles elevados de adiponectina (Delporte et al., 2003; Pannacciulli et al.,

2003). Diferentes estudios poblacionales demuestran también una relación inversa entre la expresión de mRNA de adiponectina o sus niveles séricos y el BMI (Arita et al., 1999;Weyer et al., 2001). Esta correlación inversa es todavía más sólida si se realiza entre la cantidad de adiponectina (mRNA o proteína) y la cantidad de grasa corporal determinada mediante impedancia bioeléctrica o tomografía computerizada (Kern et al., 2003).

En las concentraciones circulantes de adiponectina encontramos un dimorfismo sexual, es decir, es diferente en machos y en hembras. Los niveles totales de adiponectina y el porcentaje de formas HMW son superiores en hembras. Pero, paradójicamente las hembras tienen un mayor porcentaje de grasa corporal respecto a los machos para un mismo BMI. Así pues, la relación entre grasa corporal y adiponectina no explicaría este dimorfismo sexual sugiriendo que existen otros factores, aparte de la cantidad de grasa corporal, que regulan la cantidad de adiponectina circulante (Combs et al., 2003).

Estudios en primates sugieren que la adiponectina circulante disminuye con la ganancia de peso a medida que el animal se va haciendo obeso (Hotta et al., 2001). Esta situación es reversible, ya que la pérdida significativa de peso produce un incremento en la expresión de adiponectina, tal y como se ha observado en pacientes humanos tras someterse a cirugía bariátrica (Yang et al., 2001;Faraj et al., 2003;Pender et al., 2004). Además, esta recuperación de la concentración de adiponectina circulante va acompañada de una mejora en la sensibilidad a la insulina (Yang et al., 2001). De la misma manera, los niveles de adiponectina circulante, así como la sensibilidad a la insulina, pueden incrementar en personas

obesas que se someten a un control estricto de la dieta (Bruun et al., 2003;Lihn et al., 2004).

2.5. Adiponectina y distribución de la grasa corporal.

La concentración de adiponectina sérica tiene una marcada relación inversa con la grasa abdominal (Cnop et al., 2003;Gavrila et al., 2003). Se ha sugerido que la adiponectina circulante correlaciona mejor con la grasa abdominal que con la subcutánea. Análisis “*ex vivo*” del tejido adiposo de sujetos delgados y de sujetos obesos demuestran que hay niveles más bajos de proteína adiponectina y de su mRNA en el tejido adiposo omental en comparación con el subcutáneo (Statnick et al., 2000;Fisher et al., 2002). Esto sugiere, que no es exclusivamente la cantidad de grasa corporal, sino su distribución, la que puede determinar los niveles de adiponectina.

La comparación de la expresión de adiponectina en los diferentes depósitos de grasa de sujetos delgados, obesos y obesos diabéticos demuestra que la expresión es más baja en la grasa visceral que en la subcutánea en todos los grupos (Statnick et al., 2000;Lihn et al., 2004). Estos resultados deben ser considerados con cautela, ya que los niveles de expresión de mRNA de adiponectina no siempre corresponde con los niveles de proteína detectados (Combs et al., 2003).

2.6. Adiponectina y lipodistrofia.

La lipodistrofia se caracteriza por la pérdida o la redistribución del tejido adiposo junto con otras alteraciones metabólicas como la diabetes, la resistencia a la insulina, dislipidemia y esteatosis hepática. Debido a la similitud que presenta la lipodistrofia con el síndrome metabólico, se ha estudiado el papel de la adiponectina y el resto de adipocinas en la patogénesis de esta enfermedad. Diferentes estudios demuestran que tanto la lipodistrofia congénita como la asociada a la infección con el VIH están relacionadas con una disminución en los niveles de adiponectina. Se ha demostrado que en el caso de la lipodistrofia congénita la reducción en los niveles de adiponectina es proporcional a la reducción de grasa corporal (Haque et al., 2002). En el caso de la lipodistrofia asociada a la infección con el virus VIH los niveles de adiponectina son proporcionales a la redistribución de los depósitos de grasa de la periferia hacia depósitos más centrales (Mynarcik et al., 2002).

2.7. Adiponectina y resistencia a la insulina.

Se ha postulado que la adiponectina estimula la sensibilidad a insulina disminuyendo la producción hepática de glucosa, contribuyendo así, a una mejor regulación de la glucemia. Estudios en humanos correlacionan los niveles de adiponectina y la supresión basal de la producción de glucosa mediada por insulina (Stefan et al., 2003). Además, la hipoadiponectinemia está asociada en humanos con la resistencia a la insulina (Weyer et al., 2001; Kern et al., 2003), a la resistencia a la insulina en diabetes gestacional (Ranheim et al., 2004), a diabetes asociada a lipodistrofia (Kosmiski et al., 2003) y a diabetes tipo 2 (Hotta et al., 2000). Un factor a destacar es que los niveles de adiponectina son bajos en individuos resistentes a

la insulina independientemente de que sean obesos (Abbasi et al., 2004). Estos datos sugieren que la hipoadiponectinemia contribuye a los cambios en la regulación de la homeostasis de la glucosa y al descenso en la sensibilidad hepática a la insulina observados durante la diabetes.

Estas evidencias de la relación de la hipoadiponectinemia con el desarrollo de resistencia a insulina y diabetes vienen además confirmadas por estudios genéticos. En ellos, se han asociado diferentes polimorfismos que provocan hipoadiponectinemia con el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes. El locus donde se codifica la adiponectina se ha asociado con la diabetes (Vasseur et al., 2003). Además, estudios más recientes demuestran que los niveles bajos de adiponectina predicen el riesgo de padecer diabetes tipo 2, incluso en ausencia de otros marcadores de resistencia a insulina (Lindsay et al., 2002; Spranger et al., 2003). Otras evidencias de la clara relación entre adiponectina y sensibilidad a la insulina son los efectos de la insulina sobre los niveles de adiponectina circulante. Se ha demostrado *in vivo* que la insulina disminuye los niveles de adiponectina tanto en humanos como en ratones (Combs et al., 2001; Yu et al., 2002). Resultados similares se han obtenido al tratar con insulina adipocitos *in vitro* (Halleux et al., 2001; Fasshauer et al., 2002; Motoshima et al., 2002). Por otro lado, se ha encontrado que los pacientes diabéticos tipo 1 presentan niveles mayores de adiponectina (Imagawa et al., 2002). Así pues, estos datos sugieren que la hiperinsulinemia podría tener un impacto negativo en los niveles de adiponectina circulante lo cual llevaría a resistencia a la insulina. Sin embargo, y debido a que la hiperinsulinemia suele ir acompañada de resistencia a la insulina *in vivo*, es difícil establecer por separado cuál es la contribución de los niveles de adiponectina y de

insulina en el desarrollo de resistencia a la insulina. En cualquier caso, estudios en primates indican que el descenso en los niveles de adiponectina precede al desarrollo de la hiperinsulinemia (Hotta et al., 1998; Hotta et al., 2001) indicando que el descenso en los niveles de adiponectina puede ser una causa y no una consecuencia de la hiperinsulinemia.

Los factores que intervienen en el descenso de los niveles de adiponectina no son del todo conocidos. Se ha descrito que el tratamiento de con tiazoladinedionas (TZDs), que son potentes agonistas de PPAR γ , incrementa los niveles de adiponectina circulante tanto en humanos como en ratones (Combs et al., 2002). En cambio, este efecto no se ha observado con los agonistas de PPAR α (Combs et al., 2002). Este efecto de la TZDs sobre la producción de adiponectina podría ser directo en el tejido adiposo (Maeda et al., 2001). Sin embargo, se desconoce si este efecto es debido a un incremento en la diferenciación de los adipocitos (Combs et al., 2003) o a la unión con elemento de respuesta a PPAR γ que se encuentra en el promotor de la adiponectina (Iwaki et al., 2003).

2.8. Adiponectina y aterosclerosis.

Existen también evidencias de que la adiponectina tiene un efecto protector ante el desarrollo de aterosclerosis. Ratones genosuprimidos que carecen del gen de la adiponectina presentan un mayor engrosamiento de la neoíntima en respuesta a un daño vascular externo (Kubota et al., 2002). Además, la expresión de adiponectina exógena en ratones apoE $^{-/-}$, que presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar aterosclerosis, conduce a una menor susceptibilidad de desarrollar esta enfermedad (Okamoto et al., 2002). Algunos estudios *in vitro* postulan que los efectos

protectores de la adiponectina serían debidos a su capacidad para disminuir los factores de adhesión vascular en las células endoteliales (Ouchi et al., 1999). También, se ha descrito que la adiponectina inhibe la formación de la célula espumosa y la migración de las células de la musculatura lisa (Arita et al., 2002; Matsuda et al., 2002) y ejerce efectos antiinflamatorios en macrófagos (Yokota et al., 2000). Sin embargo, y debido a que en la mayoría de estudios se utilizó la forma globular de la adiponectina, no está del todo claro si la forma completa de la adiponectina podría mediar estos efectos.

Además, la adiponectina podría tener efectos antiaterogénicos a través de la modulación del metabolismo lipídico. Estudios clínicos demuestran que los niveles de adiponectina están correlacionados negativamente con los niveles en sangre de triglicéridos y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y positivamente con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Hotta et al., 2000; Kazumi et al., 2002; Hulthe et al., 2003). Además, estudios de población demuestran que la relación de la adiponectina con los lípidos en sangre es independiente de edad, género, BMI y sensibilidad a insulina (Yamamoto et al., 2002; Cnop et al., 2003; Baratta et al., 2004). Los mecanismos que intervienen en la regulación de los lípidos circulantes por parte de la adiponectina son desconocidos aunque, en parte, puedan estar relacionados con sus efectos directos en el hígado y en el tejido adiposo.

También, diferentes trabajos han descrito una relación inversa entre la adiponectina circulante y diferentes parámetros marcadores de enfermedades vasculares (Hotta et al., 2000; Kojima et al., 2003; Kumada et al., 2003; Pischon et al., 2004). Además, la hipoadiponectinemia podría explicar en parte por qué algunos grupos étnicos

tienen más tendencia a desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades coronarias (Degawa-Yamauchi et al., 2003b; Hulver et al., 2004; Retnakaran et al., 2004). Aunque estos datos sugieren que factores como la dislipidemia y la inflamación vascular pueden contribuir a la relación entre la hipoadiponectinemia y las enfermedades vasculares, los mecanismos que subyacen a esta relación son desconocidos.

3. DIABETES TIPO 2.

3.1. Definición.

La diabetes tipo 2 es la forma más frecuente de diabetes, ya que afecta al 90-95% de la población diabética. A diferencia de la diabetes tipo 1, esta patología no es debida a un ataque autoinmune que destruya la célula β pancreática provocando la ausencia de insulina. La aparición de la diabetes tipo 2 está relacionada con la edad y los hábitos teniendo normalmente una prevalencia mayor en adultos a partir de 40 años con una vida sedentaria y, generalmente, obesos. La diabetes tipo 2 se caracteriza por la aparición de resistencia a la insulina (DeFronzo et al., 1992;DeFronzo, 2004).

La insulina regula la homeostasis de la glucosa en diferentes tejidos. Reduce la producción de glucosa, disminuyendo la glucogenolisis y la gluconeogénesis a nivel hepático, y aumenta la captación de glucosa en la musculatura estriada, tejido adiposo e hígado. La insulina también afecta al metabolismo lipídico incrementando la síntesis de lípidos en hígado y tejido adiposo y atenuando la liberación de ácidos grasos a partir de triglicéridos en músculo y tejido adiposo. Así pues, la resistencia a la insulina se define como un defecto en la transducción de la señal de esta hormona en los diferentes tejidos diana. Esta resistencia implica una menor capacidad de la hormona para ejercer sus efectos en los tejidos periféricos tales como el músculo, el hígado y el tejido adiposo. Este mecanismo desencadena que la célula β pancreática intente compensar este defecto de función secretando más insulina y provocando la hiperinsulinemia característica de esta enfermedad. Con el tiempo, las células β , responsables de la producción de insulina, pueden llegar a agotarse provocando una pérdida casi total de la secreción de insulina y el

establecimiento de una diabetes abierta (DeFronzo et al., 1992;DeFronzo, 2004). Independientemente de la causa, la resistencia a la insulina desencadena un aumento de la glucemia, que puede contribuir al mantenimiento de la propia resistencia a la insulina y además, provocar un efecto tóxico para la célula β .

En general, el tratamiento de los pacientes diabéticos de tipo 2, consiste en una dieta restringida dado que una disminución de la obesidad puede conducir a una mejora substancial de la enfermedad. La dieta estricta puede ser combinada con el tratamiento de hipoglucemiantes orales. Sin embargo, los pacientes que finalmente progresan hacia el agotamiento de la célula β y la deficiencia de insulina, deberán tratarse con la hormona (Moller, 2001). El avance en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la resistencia insulina está favoreciendo la aparición de nuevas dianas para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas (Moller, 2001).

3.2. Patogénesis.

Los factores relacionados con el inicio y el desarrollo de la diabetes tipo 2 no son del todo conocidos. En realidad, la diabetes tipo 2 se trata de una patología heterogénea con una fuerte correlación entre factores ambientales y factores genéticos (Zimmet et al., 2001).

En el desarrollo de la diabetes tipo 2 se deben tener en cuenta factores genéticos que susceptibilizan a la aparición de esta enfermedad. Se han identificado una gran cantidad de genes relacionados con la susceptibilidad de padecer diabetes tipo 2 (Barroso, 2005;Hansen and Pedersen, 2005;Malecki, 2005). La mayoría de estos

genes de susceptibilidad están relacionados con la secreción de insulina y su mecanismo de acción en los tejidos periféricos (Kahn et al., 1996; Virkamaki et al., 1999). Se ha descrito que mutaciones en un único gen pueden provocar resistencia a la insulina en humanos. Así, diferentes mutaciones en el gen del receptor de la insulina (IR) (Moller et al., 1990; Moller et al., 1994), el sustrato del receptor de la insulina-1 (IRS-1) (Whitehead et al., 1998), la fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3-quinasa) (Hansen et al., 2001), entre otras, se han asociado con la resistencia a la insulina en humanos. Sin embargo, estas mutaciones sólo pueden explicar un pequeño porcentaje de los pacientes diabéticos de tipo 2. La importancia de la base genética podría explicar la elevada prevalencia de esta enfermedad en ciertas poblaciones como en los indios Pima americanos. Hay que tener en cuenta que esta base genética aportaba ventajas evolutivas, ya que se promueve el depósito de grasas y el almacenamiento de calorías en tiempos de abundancia. De esta manera, en épocas de escasez, los individuos con este componente genético presentarían una mayor supervivencia. Pero con la occidentalización de estas poblaciones con dietas energéticas, ricas en carbohidratos y grasas saturadas, se desencadena la progresión de la obesidad y la diabetes alcanzando niveles epidémicos (Ong and Dunger, 2000; Zimmet et al., 2001; Prentice et al., 2005).

Entre los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la diabetes tipo 2 se encuentran la obesidad, la poca actividad física y la edad. Además, se deben considerar otros factores ambientales como el tipo de dieta y el estrés. Todos estos factores ambientales, típicos de las sociedades occidentales, son los responsables de la mayor incidencia de esta enfermedad en las sociedades modernas (Zimmet et al., 2001). En el caso de la obesidad, aproximadamente un 45% de los hombres y

un 70% de las mujeres con diabetes tipo 2 son obesas. Los mecanismos que relacionan el aumento de grasa corporal que caracteriza la obesidad con el establecimiento de la resistencia a la insulina no están del todo claros. Además, la resistencia a la insulina puede contribuir al mantenimiento de la obesidad. Este hecho se debe a que el efecto antilipolítico de la insulina requiere mucho menos actuación de ésta que la estimulación del transporte de glucosa. Así pues, incluso en los casos de resistencia a la insulina en los que el transporte de glucosa está alterado, el efecto antilipolítico de esta hormona se conserva permitiendo el incremento de los depósitos de grasa.

Tanto en el músculo esquelético como en el tejido adiposo la unión de la insulina a su receptor, la fosforilación de éste, su actividad tirosina quinasa y la fosforilación de los diferentes sustratos del receptor de la insulina (IRSs) está disminuida en personas obesas con diabetes tipo 2 (Rondinone et al., 1997; Goodyear et al., 1995). Los adipocitos de humanos obesos con diabetes tipo 2 presentan una disminución de la expresión de IRS-1 y de la actividad PI 3-quinasa asociada (Rondinone et al., 1997). En cambio, en el músculo esquelético, los niveles de IRS-1 e IRS-2 son normales pero la actividad PI3-quinasa asociada está disminuida (Kim et al., 1999). En casos de obesidad mórbida, existe una reducción de la fosforilación del receptor de la insulina y de IRS-1, así como de la actividad PI3-quinasa en músculo (Goodyear et al., 1995). Todavía no está claro si el defecto en la señalización de la insulina es el mecanismo mediante el cual se genera hiperinsulinemia o si es una consecuencia de esta (Goodyear et al., 1995). Los factores ambientales y su interacción con la base genética, serán pues, claves tanto en el desarrollo de obesidad como en desarrollo de diabetes de tipo 2.

4. MODELOS ANIMALES DE DIABETES TIPO 2.

Es importante la utilización de modelos animales que mimeticen las diferentes patologías. De esta manera, se pueden estudiar los mecanismos patogénicos que intervienen en el desarrollo de la enfermedad y ensayar diferentes aproximaciones terapéuticas para la prevención y el tratamiento de la enfermedad. Los modelos animales de enfermedades pueden generarse espontáneamente, o bien, ser inducidos experimentalmente en diversas especies. En algunos casos, para la obtención del modelo animal de la patología, se pueden combinar ambas situaciones.

4.1. Modelos espontáneos.

Gran parte de los modelos animales de diabetes tipo 2 son fruto de mutaciones monogénicas como en el caso de los ratones *ob/ob* y *db/db* o las ratas *fa/fa*. También, pueden ser debidas a defectos poligénicos como en el caso del ratón obeso New Zealand (NZO) y del hámster chino (Bray and York, 1971).

Las mutaciones más estudiadas en ratones son las mutaciones recesivas que afectan al gen de la leptina (*ob*) y a su receptor (*db*). La leptina se sintetiza exclusivamente en el tejido adiposo y actúa a nivel hipotalámico inhibiendo el hambre, estimulando el gasto energético y provocando una pérdida de peso corporal (Zhang et al., 1994). Así pues los ratones con la mutación “*ob*” en homocigosis en el gen de la leptina, ratones *ob/ob*, presentan una leptina no funcional de forma que son hiperfágicos, presentan un menor gasto energético y desarrollan obesidad severa (Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995).

Efectos similares se encuentran en el caso de que el receptor de la leptina sea no funcional (Tartaglia et al., 1995). Los ratones *db/db* presentan características similares a los *ob/ob* pero, en este caso, los animales son hiperleptinémicos y resistentes a leptina (Chen et al., 1996). Las ratas *fa/fa* serían el equivalente en ratas a los ratones *db/db* presentando características similares (Phillips et al., 1996). Además, debemos tener en cuenta la base genética o cepa animal utilizada, ya que, el desarrollo de la patología en el modelo puede variar según las interacciones con diferentes genes. Se ha demostrado que ratones *db/db* en base genética C57BL/Ks desarrollan hiperglucemia e hiperinsulinemia a edades tempranas asociada a una posterior necrosis de la célula β y atrofia de los islotes (Lee et al., 1996). También, se encuentran diferencias según la base genética en el caso de los ratones obesos NZO (Igel et al., 1997).

4.2. Modelos inducidos experimentalmente.

Modelos experimentales similares a la diabetes tipo 2 pueden ser inducidos mediante: 1) destrucción química por estreptozotocina o eliminación quirúrgica de la masa de célula β , 2) lesión del hipotálamo ventromedial afectando al centro de la saciedad, 3) alimentación con dietas con alto contenido en lípidos o azúcares, 4) malnutrición *in utero*, 5) dosis elevadas de glucocorticoides y 6) exposición a hiperinsulinemia. Además, en nuestro laboratorio se han generado diversos modelos de ratones transgénicos que presentan intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y obesidad, como por ejemplo ratones que expresan IGF-II en páncreas (Devedjian et al., 2000), ratones que expresan PEPCK en hígado (Valera et al., 1994) o tejido adiposo (Franckhauser et al., 2002) y animales que sobreexpresan GK en hígado (Ferre et al., 2003).

4.2.1. Dieta alta en lípidos.

Como se ha indicado con anterioridad, está ampliamente aceptada la relación existente entre la dieta, la obesidad y el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. Cuando ratas o ratones son alimentados con una dieta de alto contenido lipídico desarrollan rápidamente resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia, y en cepas genéticamente susceptibles, también diabetes (Kraegen et al., 1986; Storlien et al., 1986; Surwit et al., 1988; Winzell and Ahren, 2004). La utilización de animales alimentados con dieta alta en lípidos es un modelo de interés ya que permitirán estudiar los mecanismos que conducen a la resistencia a la insulina en individuos obesos con tolerancia a la glucosa alterada o diabetes tipo 2. Además, se ha analizado en ratón, mediante técnicas de proteómica, cómo afecta la alimentación con dieta alta en lípidos a la expresión de diferentes proteínas en diferentes tejidos (Schmid et al., 2004). Sin embargo, ha de tenerse en cuenta la respuesta heterogénea de los animales a la dieta alta en lípidos (Burcelin et al., 2002). No obstante, nos encontramos ante un modelo bien descrito y ampliamente utilizado para el estudio de la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2.

4.3. Ratones genosuprimidos (*knock-out*).

A través de la delección dirigida de genes implicados en el desarrollo de obesidad y diabetes se pueden generar animales que simulen la enfermedad humana. En general, los modelos animales genosuprimidos con alteraciones monogénicas en la acción de la insulina han permitido estudiar el papel potencial de las moléculas de señalización de la insulina en la resistencia a la hormona a nivel específico de tejido. Un ejemplo de estos animales es el animal genosuprimido total para el

receptor de la insulina (IR). Este animal presenta diabetes severa y muerte postnatal a los 3-7 días del nacimiento (Accili et al., 1996; Bruning et al., 1997). En cambio, la disrupción específica de este gen en un tejido concreto tendrá efectos diferentes. En músculo, la disrupción del gen IR produce un incremento del tejido adiposo, triglicéridos y ácidos grasos (Bruning et al., 1998; Kim et al., 2000). La falta de IR en hígado provoca intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y alteración en la función hepática (Michael et al., 2000). En célula β altera la secreción de insulina y desarrolla progresivamente intolerancia a la glucosa (Kulkarni et al., 1999). La delección del gen de IR en cerebro provoca resistencia a insulina, un incremento del tejido adiposo y de leptina e hipogonadismo hipotalámico (Bruning et al., 2000). De la misma manera, delecciones en los genes IRS-1 (Araki et al., 1994; Tamemoto et al., 1994) o IRS-2 (Withers et al., 1998; Kido et al., 2000) producen resistencia a insulina, pero ésta no va acompañada del mismo fenotipo.

En humanos, también se han descrito formas monogénicas de diabetes relacionadas con el receptor de la insulina (Accili et al., 1992) e IRS-1 (Ura et al., 1996) entre otros. Pero estas situaciones en que el origen de la enfermedad es monogénico sólo explican el 5% de los casos de diabetes. La diabetes tipo 2 es una enfermedad poligénica y puede implicar polimorfismos en múltiples genes que codifican por proteínas implicadas en la señalización y la secreción de insulina así como el metabolismo intermediario (Stern, 2000). Por ello, también se han obtenidos modelos transgénicos genosuprimidos combinados con dobles delecciones en heterocigosis, por ejemplo de IR e IRS-1 (Bruning et al., 1997), e incluso, la triple delección heterocigota en IR, IRS-1 e IRS-2 (Kido et al., 2000). En algunos de estos modelos, se puede observar una evidencia muy clara de los

efectos de la epistasia genética respecto al desarrollo de la enfermedad. Así, la doble genosupresión en heterocigosis de IR e IRS-1 produce resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hiperplasia de los islotes pancreáticos con progresión hacia diabetes abierta en un 50% de los animales (Bruning et al., 1997). Así mismo, se ha observado un efecto del fondo genético sobre este fenotipo dado que la misma doble genosupresión en tres cepas diferentes de ratón produce una gran variabilidad en la hiperinsulinemia, la tolerancia a la glucosa y la hiperplasia de los islotes que muestran estos animales (Kulkarni et al., 2003). Estos modelos poligénicos han apoyado la idea de que defectos menores en la secreción de insulina y/o en su acción, cuando se combinan, pueden dar lugar a diabetes.

A veces, para el estudio de la diabetes tipo 2, pueden generarse modelos mixtos de ratones modificados genéticamente expuestos a ambientes diabetogénicos. Este el caso del animal con la delección en heterocigosis de IRS-1 al que se le induce obesidad experimental (Shirakami et al., 2002).

4.3.1. Ratones genosuprimidos IRS-1^{-/-}.

El sustrato del receptor de la insulina- 1 (IRS-1) es uno de los principales transductores de la vía de señalización de la insulina. A nivel de población humana, el gen de IRS-1 es un gen altamente polimórfico, con variaciones en la secuencia codificante asociadas con diabetes de tipo 2 (Almind et al., 1993; Celi et al., 1995; Clausen et al., 1995; Mori et al., 1995).

La generación de ratones homocigotos para el gen de IRS-1(IRS-1^{-/-}) permiten el estudio *in vivo* de la función de esta proteína. Los ratones IRS-1^{-/-} muestran un

retraso en el crecimiento embrionario y postnatal (Araki et al., 1994; Tamemoto et al., 1994). Estos animales presentan resistencia severa a los efectos hipoglucemiantes de insulina y de IGF-I y muestran alteración en la tolerancia a la glucosa pero no desarrollan diabetes. Esto es debido a que presentan hiperinsulinemia compensatoria que se manifiesta por unos niveles elevados de insulina en sangre. Los animales IRS-1^{-/-} son resistentes a insulina e hiperinsulinémicos pero no presentan obesidad.

La supresión de la producción hepática de glucosa mediada por insulina no se ve afectada en los animales IRS-1^{-/-} debido a una compensación funcional mediada por IRS-2. De esta manera, se observa una normalización de la actividad PI3-quinasa estimulada por insulina equivalente a la del hígado en ratones control (Yamauchi et al., 1996; Previs et al., 2000).

A diferencia de lo que sucede en hígado, los ratones IRS-1^{-/-} muestran un defecto marcado en el transporte de glucosa estimulado por insulina y en la síntesis de glucógeno muscular (Yamauchi et al., 1996; Previs et al., 2000). A nivel molecular, este defecto es causado por una reducción en la actividad PI3-quinasa estimulada por insulina en músculo esquelético. Esta alteración no se ve compensada por IRS-2 en músculo esquelético, a pesar de que estos animales muestran mayores niveles de fosforilación de IRS-2 mediada por insulina y de actividad PI3-quinasa asociada a IRS-2 que los animales controles. De esta manera, la resistencia a la insulina en músculo en los animales IRS-1^{-/-} es la responsable de la resistencia a la insulina que presentan estos animales (Yamauchi et al., 1996). Estos resultados han sido confirmados con los resultados obtenidos en el animal genosuprimido IRS-2^{-/-}

(Withers et al., 1998) y en animales con genosupresión combinada en IR, IRS-1 e IRS-2 (Kido et al., 2000).

Se ha descrito que IRS-2 podría compensar la deficiencia de IRS-1 de forma más efectiva en hígado y célula β que en músculo esquelético (Araki et al., 1994; Yamauchi et al., 1996; Bruning et al., 1997; Withers et al., 1998). Se postula que IRS-1 e IRS-2 no tienen funciones redundantes, es decir, no son intercambiables, en tejidos que son responsables de la producción de glucosa (hígado), de la captación de glucosa (músculo y tejido adiposo) y producción de insulina (células β pancreáticas).

De esta manera, los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} se podrían considerar un modelo de resistencia a la insulina similar a los fenotipos de la diabetes tipo 2 en estado pre-diabético. Además, en este caso, la resistencia a insulina no viene generada por efectos de una dieta alta en lípidos sino por un defecto molecular conocido.

III. OBJETIVOS

La adiponectina es una hormona sintetizada en el tejido adiposo y que tiene efectos en tejidos periféricos tales como el hígado y el músculo esquelético. Uno de sus efectos más importantes es el de aumentar la sensibilidad a insulina en estos tejidos. Esto sugiere que la expresión de adiponectina en músculo esquelético podría contrarrestar la resistencia a insulina presente en algunos estados patológicos. Así pues, el objetivo general de este trabajo ha sido estudiar si la expresión de adiponectina en músculo esquelético de diferentes modelos animales podía contrarrestar la resistencia a insulina y la obesidad.

Este objetivo general se dividió en los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el efecto de la expresión de adiponectina en músculo esquelético en un modelo de obesidad y resistencia a insulina.
 - 1.1. Generar ratones transgénicos que expresen adiponectina en músculo esquelético y estudiar los cambios metabólicos asociados a dicha expresión.
 - 1.2. Estudiar los efectos en la sensibilidad a insulina y el peso corporal de la expresión de adiponectina en músculo esquelético en los animales transgénicos en condiciones de dieta alta en lípidos.
 - 1.3. Expresar adiponectina en músculo esquelético mediante vectores virales en ratones alimentados con dieta alta en lípidos y valorar su efecto en la resistencia a insulina y la obesidad.

2. Estudiar los efectos de la expresión de adiponectina en músculo esquelético en un modelo no obeso de resistencia a insulina.

2.1. Electrotransferir el gen de la adiponectina a músculo esquelético de animales genosuprimidos IRS-1^{-/-}.

2.2. Estudiar los efectos de la expresión de adiponectina en músculo esquelético en la sensibilidad a insulina y el metabolismo muscular de los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-}.

PARTE I:

**EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN
MÚSCULO ESQUELÉTICO EN LA RESISTENCIA A
INSULINA Y LA OBESIDAD**

La adiponectina es una hormona que promueve la sensibilidad a insulina y protege de la obesidad. Este hecho sugiere que la adiponectina podría ser utilizada con fines terapéuticos en patologías relacionadas con la resistencia a insulina y la obesidad (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). Se ha descrito que uno de los principales factores a través del cual la adiponectina mediaría estos efectos es el aumento de la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético (Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001; Yamauchi et al., 2002). Estos datos sugerían que la expresión constitutiva de adiponectina en músculo esquelético y sus efectos en este tejido podrían proteger de la resistencia a insulina y la obesidad inducida por una dieta alta en lípidos.

Para analizar esta hipótesis, se propuso generar un modelo transgénico que expresase adiponectina en este tejido. En primer lugar, se estudiaron qué efectos producía la adiponectina sobre la sensibilidad a insulina y la disponibilidad de glucosa en condiciones estándar de alimentación. Asimismo, se analizaron los efectos de la expresión de adiponectina en la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético de estos animales. Posteriormente, los animales transgénicos se alimentaron con una dieta alta en lípidos para evaluar el efecto protector de dicha expresión frente la obesidad y la resistencia a insulina.

De la misma manera, se expresó adiponectina en músculo esquelético de animales controles mediante la utilización de vectores virales. Estos animales se alimentaron con dieta alta en lípidos y se evaluó el efecto de la expresión de adiponectina en la resistencia a insulina y la obesidad inducida por la dieta.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO.

1.1. OBTENCIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO.

A continuación se describe el proceso de obtención del animal transgénico y del análisis de la expresión de adiponectina en estos animales. Para ello, se necesitó el diseño y construcción del gen quimérico, la microinyección de los oocitos y la detección del transgén en los posibles fundadores. Además, se realizó un estudio de la expresión de adiponectina en músculo y se comprobó que esta expresión se centraba exclusivamente en músculo esquelético.

1.1.1. Construcción del gen quimérico MLC/Adpn.

Para la generación de un animal transgénico que expresase adiponectina en músculo esquelético se creó un gen quimérico formado por el cDNA de adiponectina humana (apM1) bajo el control del promotor de la cadena ligera de la miosina (MLC). Este promotor se expresa específicamente en músculo esquelético (Rao et al., 1996). De esta manera, se podría conseguir una expresión ectópica constitutiva de adiponectina específicamente en el tejido muscular esquelético. Se ha demostrado que la adiponectina humana tiene efecto en ratón (Okamoto et al., 2002).

El promotor MLC se consiguió a partir de un plásmido previamente utilizado en nuestro laboratorio y mediante el cual ya se había conseguido expresión específica en músculo (Riu et al., 2002). Este plásmido se denominaba pMLC/hINSmut1. El cDNA completo de adiponectina humana, apM1, fue cedido por el Dr. Norikazu Maeda de la Universidad de Osaka y estaba clonado en la diana *EcoRI* del plásmido pBluescript II KS+. Este plásmido se denominó pBluescript II KS+/ apM1. La secuencia de la adiponectina humana se comprobó por secuenciación.

Así pues, para la obtención del gen quimérico se digirieron mediante el enzima de restricción *EcoRI* ambos plásmidos. De la digestión del primer plásmido se obtuvieron una banda de 3 Kb, correspondiente al vector pBluescript II KS+, y una banda de aproximadamente 0,8 Kb correspondiente al cDNA de adiponectina humana. De la digestión del segundo plásmido se obtuvieron dos bandas, una de aproximadamente 6 Kb, correspondiente a la secuencia estructural del plásmido con el promotor MLC, la señal de poliadenilación junto con un pequeño intrón del antígeno T del SV40 y el enhancer MLC 1/3, y otra de 0,5 Kb correspondiente al anterior cDNA clonado en este plásmido. La banda de 0,75 Kb, correspondiente al cDNA de la adiponectina humana se clonó en el lugar de restricción *EcoRI* del vector de expresión de 6 Kb. Al no tratarse de una inserción dirigida, se procedió a chequear si el inserto se había integrado como copia única y con el ORF en dirección 5'-3' correcta. Para ello se utilizaron las dianas de restricción *Bgl I*, *XhoI*, *ApaI* y *BssHII* (ver Materiales y Métodos). El plásmido así obtenido se denominó pMLC/apM1 (Figura 1).

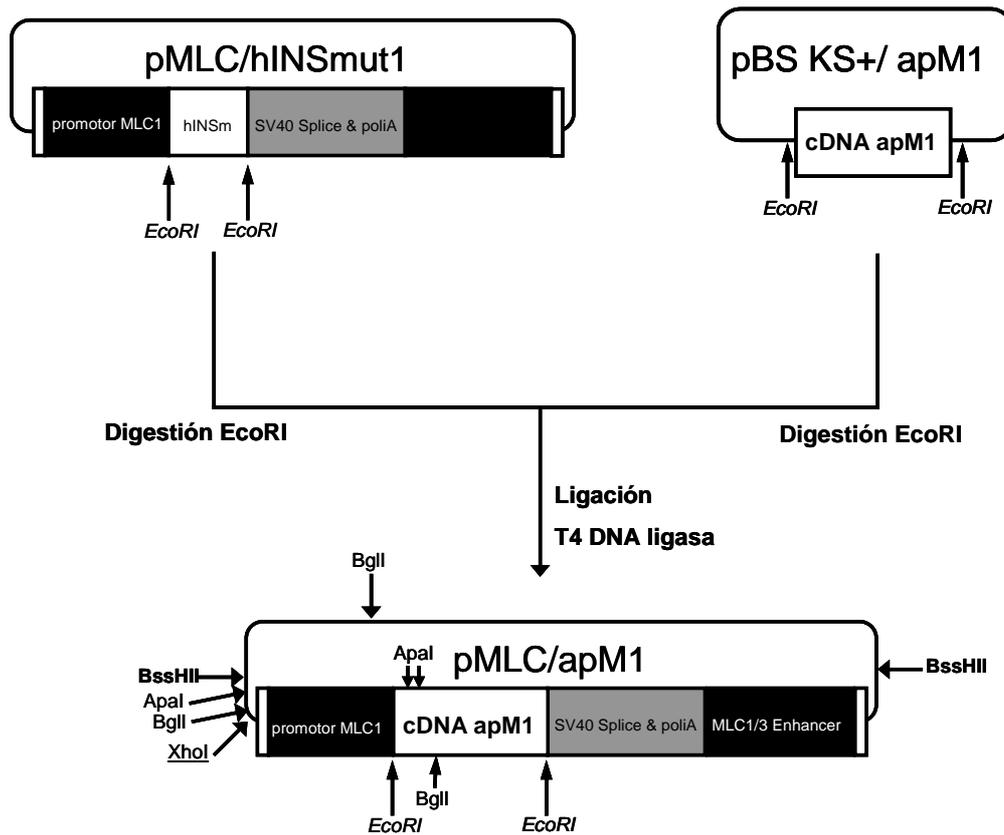


Figura 1. Construcción del gen quimérico MLC/Adpn. Las dianas *EcoRI* son las que se utilizaron para la clonación. El resto de dianas indicadas se utilizaron para chequear la orientación y el número de copias de cDNA insertadas en la ligación. Además, *BssHII* se utilizó para obtener el constructo a microinyectar en embriones. *XhoI* es diana única en el constructo (ver Materiales y Métodos).

1.1.2. Generación de ratones transgénicos.

El gen quimérico MLC/Adpn se obtuvo del plásmido pMLC/apM1 mediante digestión con el enzima de restricción *BssHII* (ver Figura 1). El fragmento *BssHII*- *BssHII* de 4 kb obtenido se purificó mediante electroelución y se microinyectó en oocitos fecundados de ratón que se transfirieron posteriormente a hembras receptoras.

A las tres semanas del nacimiento se analizó la presencia del transgén mediante análisis por Southern blot y PCR del DNA genómico. Para el análisis mediante Southern blot, el DNA genómico obtenido se digirió con la enzima *Bgl II* (no confundir con la diana *Bgl I* utilizada para comprobar la dirección de la inserción del

cDNA de apM1). Se analizó la presencia de la banda de 4 Kb proveniente de la integración en tándem del gen quimérico (Figura 2). Los resultados obtenidos del Southern blot mostraban la existencia de las dos líneas transgénicas.

Se obtuvieron dos animales fundadores que habían integrado el transgén en su genoma de un total de treinta y cinco animales analizados. A partir de estos dos fundadores diferentes se obtuvieron dos colonias de animales transgénicos que se denominaron línea 16 y línea 17. Estas líneas de animales transgénicos se cruzaron con animales controles C57Bl6.

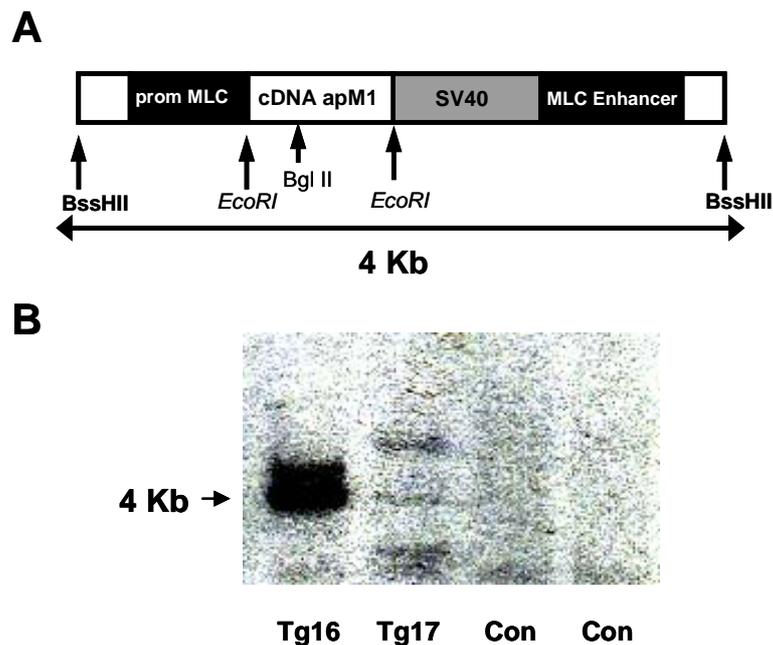


Figura 2. (A) Representación esquemática del gen quimérico MLC/Adpn con la diana utilizada para el Southern blot. **(B)** El fragmento de 4 Kb correspondiente a la inserción en tándem del gen quimérico fue detectado mediante Southern blot .

Los resultados obtenidos mediante Southern blot se confirmaron mediante técnicas de PCR. Para ello, se utilizaron dos reacciones diferentes con distintos cebadores

que permitían detectar la presencia del gen quimérico (Figura 3A) tal y como se indica en Materiales y Métodos. La medida de 250 pb y 380 pb de los productos de amplificación de las dos reacciones correspondía con la medida de los fragmentos esperados (Figura 3B). La técnica de PCR fue la utilizada para el genotipado de la mayor parte de los animales utilizados en este estudio ya que permite la obtención de resultados fiables de forma rápida.

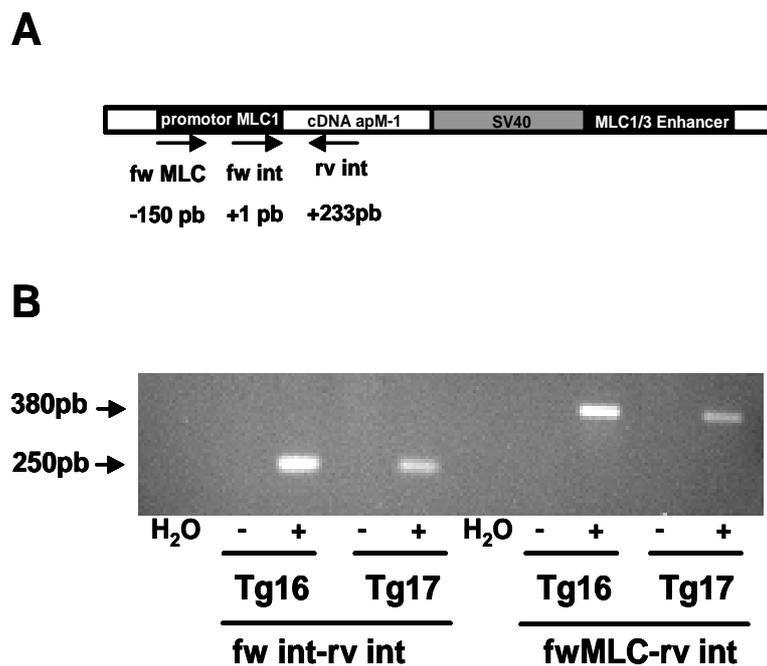


Figura 3. (A) Esquema de la localización de los cebadores utilizados en la PCR. Representación de la ubicación de los cebadores utilizados para la de detección del gen quimérico MLC/Adpn mediante PCR. **(B) Electroforesis de los productos de PCR.** Se determinó el tamaño de los productos de PCR obtenidos en las dos reacciones de PCR en las que se han utilizado el par de cebadores fw MLC y rv int y el par de cebadores fw int y rv int.

1.1.3. Análisis de la expresión de adiponectina en músculo esquelético.

Una vez confirmada la presencia del transgén se procedió a obtener RNA total de músculo esquelético de ratones controles y transgénicos. Este RNA fue analizado mediante Northern blot para determinar la presencia del mRNA de la adiponectina humana. En los ratones transgénicos se detectó la presencia del transcrito de

adiponectina como resultado de la expresión del transgén en el músculo esquelético (Figura 4). Esta expresión no fue detectada en el músculo de ratones controles. Este resultado indicaba que las líneas de animales transgénicos obtenidas eran capaces de expresar mRNA de adiponectina específicamente en el músculo esquelético.

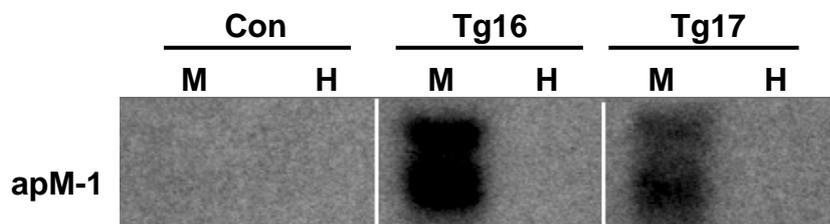


Figura 4. Expresión de adiponectina humana en músculo esquelético de ratones transgénicos MLC/Adpn. Análisis por Northern blot de los niveles de expresión del gen de la adiponectina en músculo. Se extrajo RNA total de músculo esquelético (M) e hígado (H) de ratones controles (Con) y transgénicos de las líneas 16 (Tg16) y 17 (Tg17) alimentados con dieta estándar de laboratorio. Las membranas se hibridaron con el cDNA de la adiponectina humana (apM1).

1.1.4. Análisis de la presencia de la proteína adiponectina.

Una vez confirmada la expresión del mRNA de adiponectina en el músculo esquelético de los animales transgénicos el siguiente paso fue analizar si éste era traducido. Para ello, se determinó la presencia de la proteína adiponectina humana en el tejido muscular mediante Western blot y sus niveles circulantes en sangre mediante técnicas de ELISA. De esta manera se podía distinguir si la producción ectópica de adiponectina tendría efecto a nivel local en el músculo esquelético o si, además, se podrían esperar efectos a nivel periférico.

Para detectar la presencia de la adiponectina humana en el tejido se obtuvieron extractos musculares de animales controles y transgénicos y se analizaron por Western blot e incubación de la membrana con un anticuerpo específico contra adiponectina humana (Figura 5). Se detectó la banda de 30 KDa específica de la adiponectina en las dos líneas que expresaban el transgén. La banda superior detectada corresponde a un diferente estado de desnaturalización de la proteína y es normal su presencia en la detección mediante Western blot de esta proteína (Pajvani et al., 2003; ShklyaeV et al., 2003; Satoh et al., 2005). Los resultados obtenidos indicaban que ambas líneas de animales transgénicos expresaban la proteína adiponectina en el músculo esquelético. En cambio, los animales controles no presentaron adiponectina humana en este tejido.

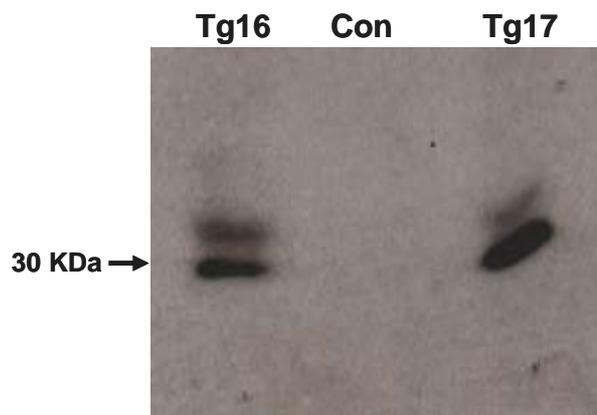


Figura 5. Adiponectina humana en músculo esquelético de ratones transgénicos MLC/Adpn. Análisis mediante Western blot de la presencia de adiponectina humana en músculo de animales controles (Con) y de las líneas de transgénicos 16 (Tg16) y 17 (Tg17). Las membranas se incubaron con un anticuerpo específico contra adiponectina humana (apM1).

Los niveles circulantes de adiponectina murina y humana se determinaron mediante ensayos RIA y ELISA, respectivamente. No se observaron diferencias en los valores de adiponectina murina circulante entre las líneas de ratones transgénicos y controles (Figura 6). Además, no se detectaron niveles circulantes de adiponectina humana (datos no mostrados). Estos resultados indicaban que la adiponectina

generada no pasaba eficientemente a circulación y, por tanto, muy probablemente no podría ejercer efectos sistémicos. Así pues, los posibles efectos de esta proteína en este modelo serán de origen autocrino/paracrino debido a su rápida interacción con los receptores de adiponectina presentes en el músculo esquelético. Por otro lado, la expresión ectópica de adiponectina en músculo no desencadenaba una alteración de los niveles circulantes de adiponectina endógena sintetizada en el tejido adiposo. Por tanto, estas observaciones sugieren que el modelo transgénico obtenido no se trataba tanto de un modelo de hiperadiponectinemia circulante sino de un modelo de hiperadiponectinemia local con el que estudiar los efectos de la adiponectina exclusivamente a nivel muscular.

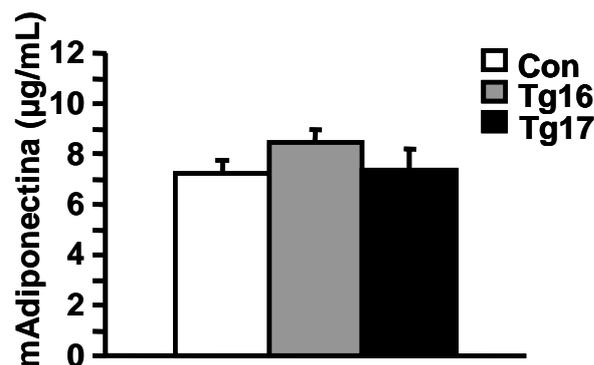


Figura 6. Niveles circulantes de adiponectina murina. Se obtuvo sangre de animales controles (Con), transgénicos de la línea 16 (Tg16) y transgénicos de la línea 17 (Tg17) y se analizaron mediante un ensayo RIA específico para detectar los niveles de adiponectina murina. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 10 animales por grupo.

1.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO EN CONDICIONES ESTÁNDAR DE ALIMENTACIÓN.

La caracterización inicial de las líneas transgénicas permitió establecer que se contaba con un modelo en el que estudiar los efectos de la expresión de adiponectina en músculo esquelético a nivel local ya que no existían cambios en los niveles de adiponectina circulante. A continuación, se determinó como afectaba la expresión de adiponectina en músculo esquelético a la glucemia, insulinemia, leptinemia y otros parámetros relacionados con el balance energético en condiciones estándar de alimentación. También se determinaron los efectos sobre la sensibilidad a insulina y la tolerancia a glucosa así como los efectos en relación con la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético. Para todos los estudios se utilizaron ratones machos controles y transgénicos.

1.2.1. Análisis de la glucemia y la insulinemia.

Se determinaron los valores de glucemia e insulinemia de ratones controles y de las dos líneas de transgénicos de tres meses de edad alimentados con dieta estándar. No se observaron diferencias ni en condiciones de alimentación ni de ayuno en los niveles de glucosa circulante entre los animales controles y los animales de las dos líneas de transgénicos MLC/Adpn (Tabla 1). Tampoco se observaron diferencias en los animales transgénicos en los niveles de insulinemia en alimentación y en ayuno (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de glucosa y de insulina en sangre

		Glucemia (mg/dL)	Insulinemia (ng/mL)
Alimentación	Control	149±5	1.72±0.12
	Tg16	144±3	1.86±0.15
	Tg17	153±5	1.77±0.09
Ayuno	Control	72±4	0.12±0.03
	Tg16	66±4	0.15±0.06
	Tg17	63±5	0.11±0.03

Los resultados están expresados como la media ± S.E. de 10 animales por grupo.

Estos resultados indicaban que la expresión de adiponectina en músculo esquelético no provocaba alteraciones en estos parámetros en animales jóvenes alimentados con dieta estándar.

1.2.2. Test de tolerancia a la insulina.

Con la finalidad de determinar si existían diferencias en cuanto a la sensibilidad a la insulina entre animales controles y transgénicos debidas a la expresión de adiponectina en músculo esquelético, se realizó un test de tolerancia a la insulina. Para ello, se les administró a animales alimentados de tres meses de edad una dosis de insulina intraperitoneal de 0,75 UI/Kg de peso. Se observó que los animales transgénicos de la línea 17 presentaban una mayor respuesta hipoglucemiante a la hormona (Figura 7). Estos resultados indicaban que la expresión de adiponectina en el músculo esquelético incrementaba la sensibilidad a insulina en estos animales.

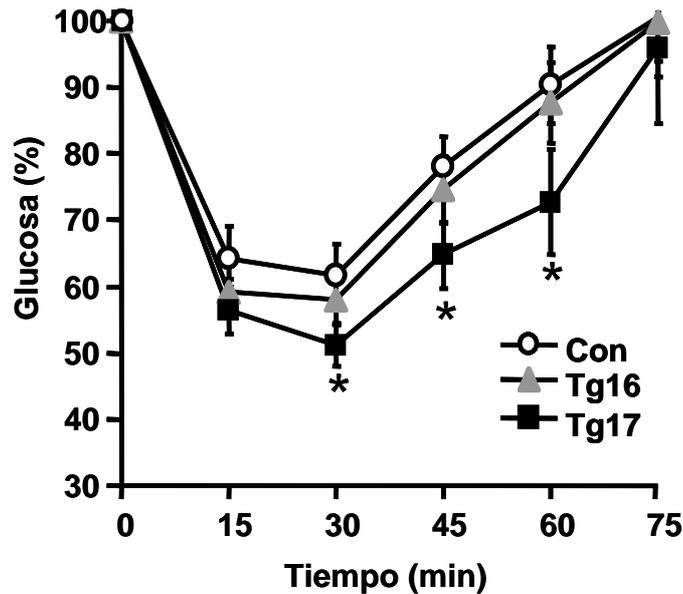


Figura 7. Test de tolerancia a la insulina. Porcentaje de disminución de la glucemia respecto al tiempo. Se inyectaron 0,75 UI de insulina por Kg de peso de ratón a ratones control (Con), transgénicos de la línea 16 (Tg16) y transgénicos de la línea 17 (Tg17). Se tomaron muestras de sangre por la vena caudal a los tiempos indicados y se determinó la glucemia tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 12 animales por grupo.

1.2.3. Test de tolerancia a la glucosa.

Con el fin de determinar la capacidad de los animales MLC/Adpn de compensar una sobrecarga de glucosa se realizó un test de tolerancia intraperitoneal a este azúcar. Con este fin, se inyectaron intraperitonealmente 2 g de glucosa/Kg a ratones de tres meses de edad tras ser ayunados durante 16h. No se observaron diferencias significativas en los niveles basales de glucosa entre el grupo control y las dos líneas de transgénicos (Figura 8). De la misma manera, las líneas de transgénicos presentaban una respuesta similar a la glucosa que los controles. El efecto de la sobrecarga de glucosa era similar en los tres grupos. El aumento de la glucosa circulante fue transitorio y gradualmente volvieron a los niveles basales tanto los animales controles como los animales transgénicos. Estos resultados indicaban que la expresión ectópica de adiponectina en músculo esquelético no provocaba una alteración en la tolerancia a la glucosa.

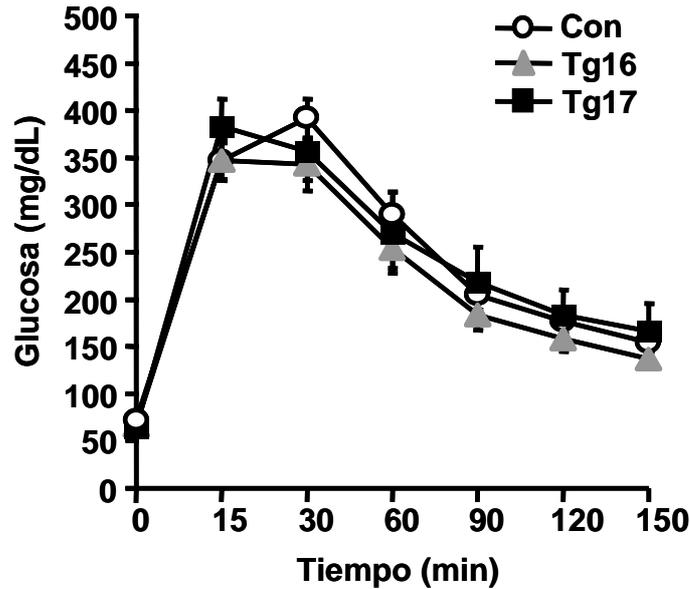


Figura 8. Test de tolerancia a la glucosa. Se realizó un test de tolerancia a la glucosa a ratones control (Con), transgénicos de la línea 16 (Tg16) y transgénicos de la línea 17 (Tg17) ayunados durante 16 h. Se administraron 2 mg de glucosa por gramo de peso vivo y a continuación se realizaron determinaciones de la concentración de glucosa en sangre a lo largo del test, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 12 animales por grupo.

1.2.4. Captación basal de glucosa.

Con el objetivo de estudiar si la mayor sensibilidad a insulina en estos animales estaba relacionada con un aumento en la captación basal de glucosa se determinaron los valores de captación de glucosa basal por el músculo esquelético en las líneas de transgénicos. Para la determinación del índice de utilización basal de la glucosa *in vivo* en el músculo esquelético y tejido adiposo blanco (WAT) y marrón (BAT), se inyectó a través de la vena yugular 2-deoxi-*D*-[1-³H]-glucosa (2-DG) a animales de tres meses de edad alimentados de los diferentes grupos experimentales. La 2-DG marcada con tritio es un análogo de la glucosa que una vez captado y fosforilado no puede ser metabolizado. Así, la determinación intratisular de 2-DG-6-fosfato es un parámetro que permite valorar la capacidad de captación y utilización de la glucosa por los tejidos. No se observaron diferencias en

la captación de glucosa entre los animales controles y transgénicos en los diferentes tejidos estudiados (Figura 9).

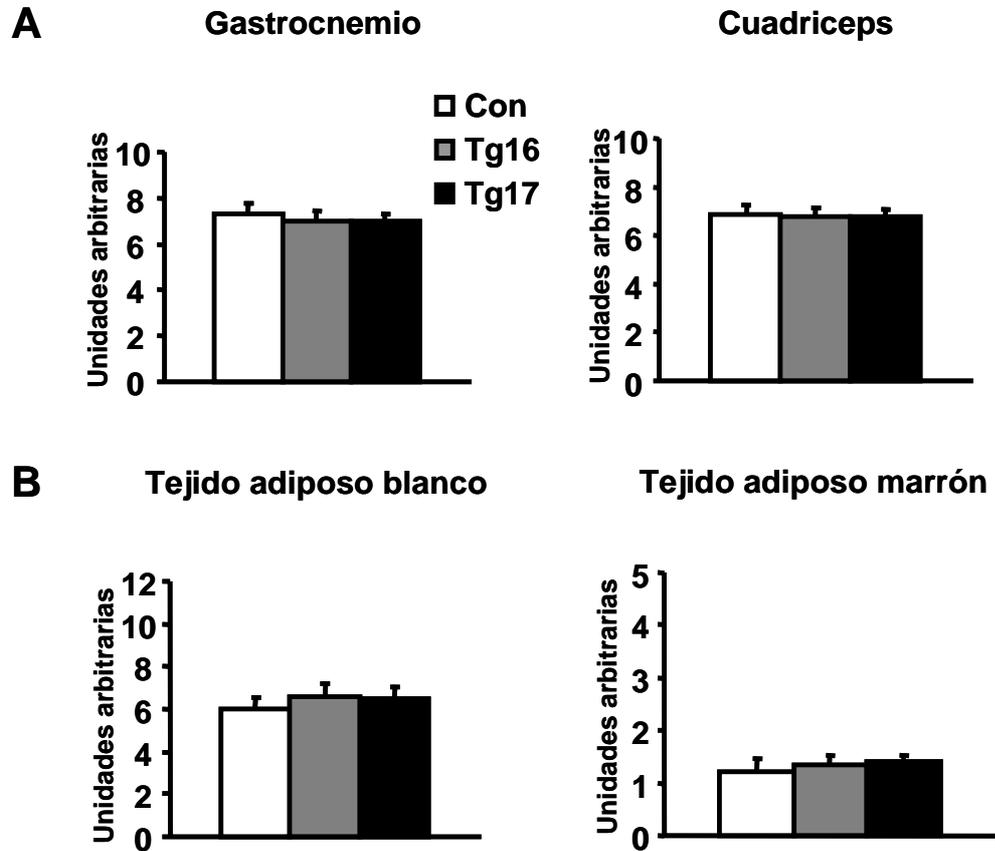


Figura 9. Captación basal de glucosa. Se determinaron los niveles de captación basal glucosa en **(A)** los músculos esqueléticos gastrocnemio y cuadriceps y **(B)** en los tejidos adiposos blanco y marrón tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 4 animales por grupo.

1.2.5. Peso corporal e ingesta de alimento.

Se estudió si los animales transgénicos presentaban algún tipo de alteración en el peso corporal. No se observaron diferencias en el peso corporal entre el grupo control y transgénico durante su desarrollo (Figura 10A). Asimismo, al determinar la ingesta de alimentos en animales alimentados *ad libitum* con dieta estándar no se observaron diferencias significativas entre los ratones controles y transgénicos (Figura 10B).

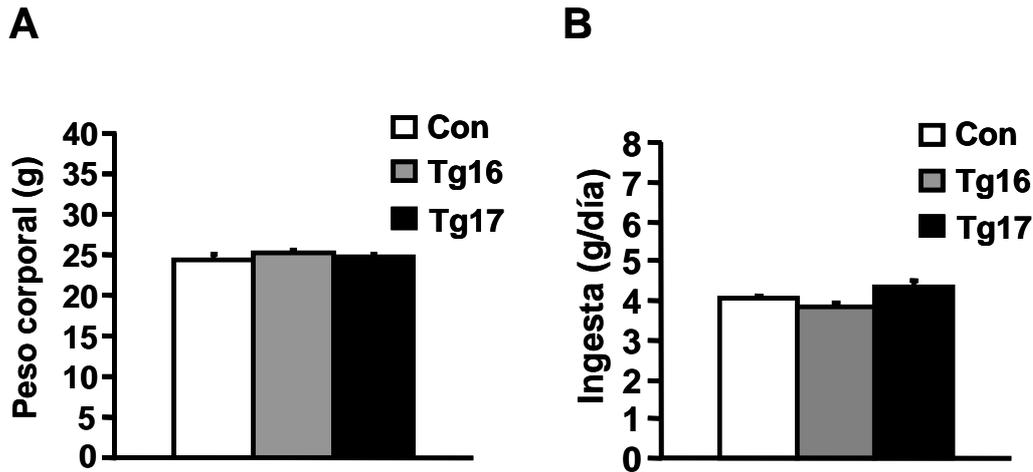


Figura 10. (A) Peso corporal. Peso corporal de animales control (Con) y transgénicos de la línea 16 (Tg16) y de la línea 17 (Tg17) a los 2 meses de edad. **(B) Ingesta de alimento.** Se determinó la ingesta de alimento diaria en animales alimentados con dieta estándar. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 12 animales por grupo.

1.2.6. Contenido de grasa corporal.

Se determinó cual era el porcentaje de grasa corporal en las líneas transgénicas del modelo MLC/Adpn a partir del contenido en triglicéridos de la carcasa. No se observaron diferencias significativas entre los grupos, pero sí se apreciaba una tendencia no significativa en los animales transgénicos a presentar una mayor cantidad de grasa corporal (Figura 11).

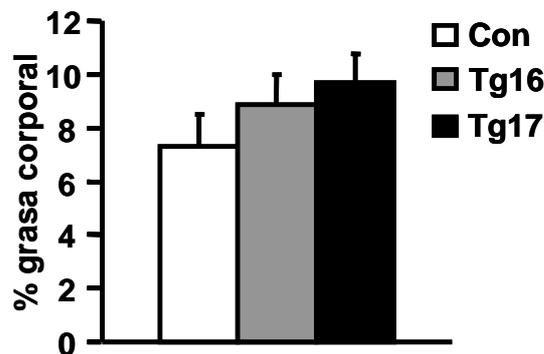


Figura 11. Contenido de grasa corporal. Se determinó el contenido de grasa corporal en los grupos experimentales tal y como se explica en Material y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 5 animales por grupo.

1.2.7. Análisis de la leptinemia.

También se determinó en animales de tres meses de edad si la expresión de adiponectina en músculo esquelético podía afectar a la concentración de leptina circulante en nuestro modelo. Los animales transgénicos mostraron una tendencia no significativa a presentar niveles más bajos de leptina en sangre que los controles (Figura 12). Este hecho apuntaba una posible interacción entre la leptina y la expresión de adiponectina en tejido muscular.

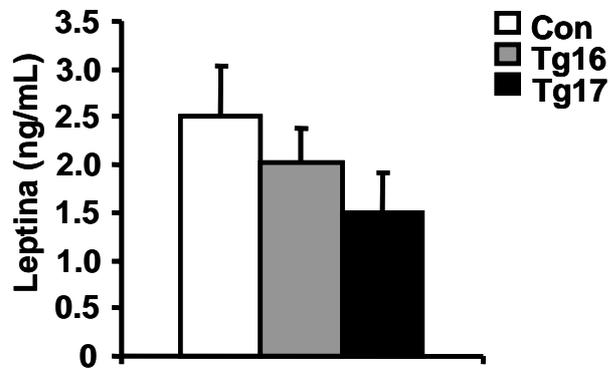


Figura 12. Niveles circulantes de leptina. Se obtuvo sangre de animales control (Con), transgénicos de la línea 16 (Tg16) y transgénicos de la línea 17 (Tg17) y se analizó la concentración de leptina tal y como se explica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 10 animales por grupo.

1.2.8. Determinación de triglicéridos en músculo.

El aumento de la oxidación de ácidos grasos en la fibra muscular está asociado con una disminución en el contenido de triglicéridos en músculo (Thamer et al., 2002). Dado que la adiponectina puede producir un aumento en la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético (Yamauchi et al., 2001; Yamauchi et al., 2002) se analizó el contenido de triglicéridos en este tejido en animales alimentados de tres meses de edad. Se detectó un menor contenido de triglicéridos en el músculo esquelético de los animales transgénicos de la línea 17 (Figura 13). El contenido de triglicéridos de la línea 17 se correlacionaba con la mayor sensibilidad a insulina detectada en esta línea.

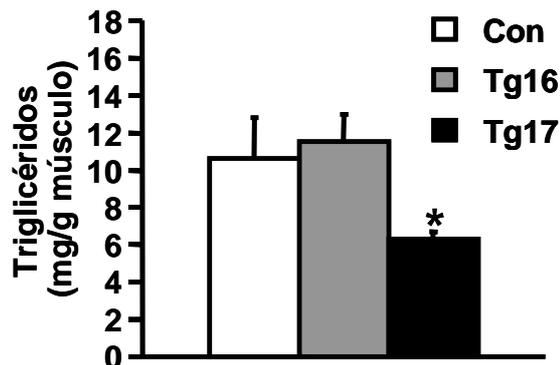


Figura 13. Contenido de triglicéridos en músculo. Se determinó el contenido de triglicéridos en músculo en los grupos experimentales tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 4 animales por grupo. * $p < 0.05$ Con vs Tg17.

1.2.9. Test de tolerancia a ácidos grasos.

Para analizar como afectaba la expresión de adiponectina en el músculo esquelético a la captación de ácidos grasos se realizó un test de tolerancia a ácidos grasos a animales de cuatro meses. Esta prueba consiste en la administración vía yugular a animales ayunados de un bolo lipídico rico en ácidos grasos y en el posterior seguimiento de la eliminación de estos ácidos grasos de la circulación. Ha sido descrito que la α Adpn incrementa la eliminación de ácidos grasos de la circulación tras la administración de un bolo lipídico (Fruebis et al., 2001). De la misma manera, animales con una delección en el gen de la adiponectina muestran una menor capacidad para eliminar ácidos grasos de la circulación tras la administración de lípidos (Maeda et al., 2002). En el presente estudio no se detectó un aumento en la captación de ácidos grasos debido a la expresión de adiponectina en el músculo esquelético (Figura 14).

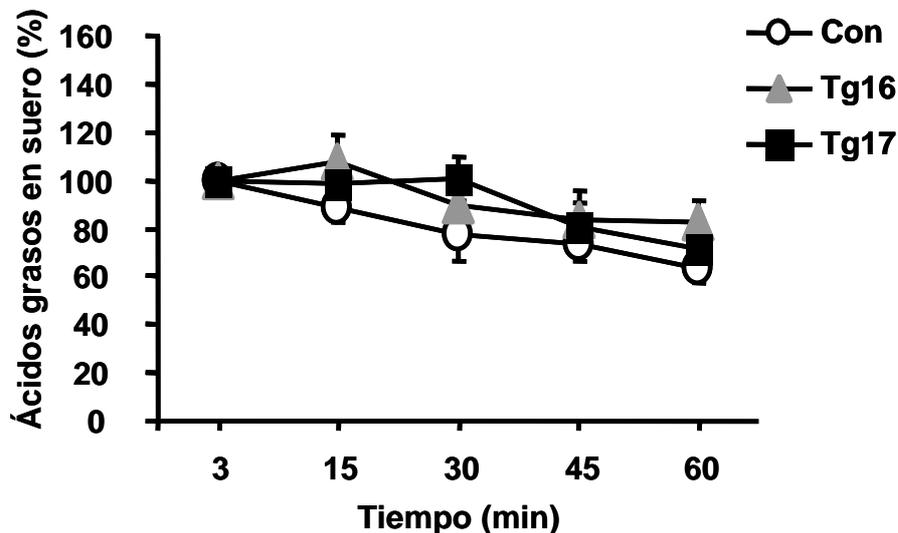


Figura 14. Test de tolerancia a ácidos grasos. A animales ayunados y anestesiados se les administraron vía yugular 30 μ l de Intralipid® 20%. Se obtuvo sangre por la vena caudal a los tiempos indicados y se determinó la concentración de ácidos grasos. Los valores obtenidos a lo largo del test se representan como porcentaje respecto la concentración de ácidos grasos en el minuto 3 tras la inyección. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 10 animales por grupo.

1.2.10. Determinación de glucógeno y lactato muscular.

Se ha descrito que la adiponectina *in vitro* puede promover la síntesis de lactato en el músculo esquelético (Yamauchi et al., 2002; Ceddia et al., 2005). Por tanto, se determinó el contenido de estos metabolitos en animales transgénicos alimentados de tres meses de edad. No se detectó un aumento en el lactato muscular en los animales transgénicos pero sí se encontró un incremento en el contenido de glucógeno muscular (Figura 15).

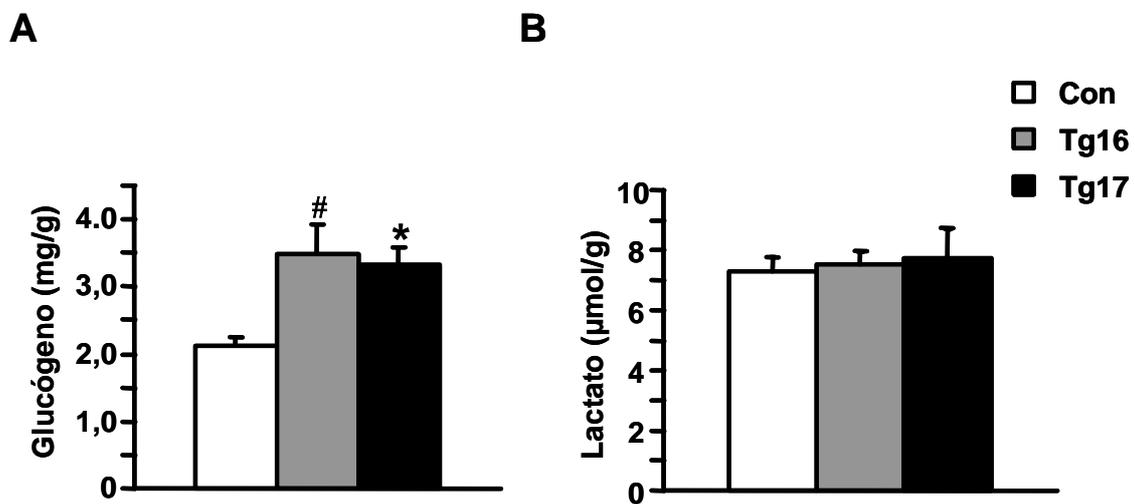


Figura 15. (A) Glucógeno muscular. Se determinó el contenido muscular de glucógeno a partir de extractos musculares de animales control (Con) y transgénicos de la línea 16 (Tg16) y de la línea 17 (Tg17). **(B) Lactato muscular.** También se determinó el contenido de lactato en las mismas muestras. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 5 animales por grupo. # $p < 0.05$ Con vs Tg16; * $p < 0.05$ Con vs Tg17.

1.2.11. Determinación del estado de activación de AMPK.

La adiponectina puede incrementar la activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) *in vitro* (Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002) e *in vivo* (Sato et al., 2005). Sin embargo, existe controversia en que forma de la adiponectina puede mediar este efecto en el tejido muscular (Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002; Sato et al., 2005). La activación de AMPK produciría un aumento en la oxidación de ácidos grasos, coherente con la disminución del contenido de triglicéridos y el aumento en la sensibilidad a insulina detectado en la línea 17. Así pues, se determinó si la expresión de adiponectina en músculo esquelético activaba AMPK en este tejido. La AMPK se activa mediante la fosforilación en el residuo treonina 172 de la subunidad α . A partir de extractos musculares de animales de 3 meses de edad se analizó el estado de activación de la AMPK en las diferentes líneas de ratones transgénicos. Se observó que la expresión de adiponectina en músculo esquelético fosforilaba AMPK en las dos líneas estudiadas (Figura 16). Los niveles de fosforilación de las líneas transgénicas 16 y 17 eran, respectivamente, de dos y tres veces los niveles detectados en los animales controles.

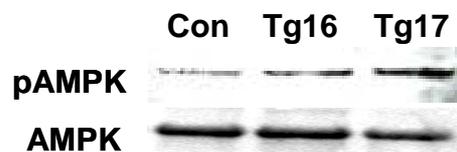


Figura 16. Niveles de fosforilación de la AMPK. Análisis mediante Western blot del estado de fosforilación de la AMPK. Se obtuvieron extractos de músculo esquelético de ratones control (Con), transgénicos de la línea 16 (Tg16) y transgénicos de la línea 17 (Tg17) alimentados con dieta estándar de laboratorio. Las membranas se incubaron con un anticuerpo específico que detecta la forma fosforilada de la subunidad α de la AMPK (pAMPK) y otro que detecta la cantidad total de AMPK α (AMPK). En la figura se muestra un Western blot representativo de los resultados obtenidos.

1.2.12. Determinación del estado de activación del enzima ACC.

La enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) participa en la síntesis de malonil-CoA a partir de acetil-CoA. El malonil-CoA es uno de los principales inhibidores de la oxidación de ácidos grasos. La ACC puede ser regulada mediante fosforilación en el residuo serina 79. La fosforilación en este residuo produce la inactivación del centro catalítico de la enzima disminuyéndose su actividad, favoreciéndose entonces, la oxidación de ácidos grasos. Esta fosforilación puede ser mediada por AMPK. Así pues, se determinaron los niveles de fosforilación de la enzima ACC en extractos musculares de ratones controles y transgénicos de tres meses de edad. En concordancia con los niveles de activación de AMPK observados, se detectó que la línea 17 presentaba una mayor fosforilación de la ACC, indicando una mayor inactivación del enzima en esta línea transgénica (Figura 17).

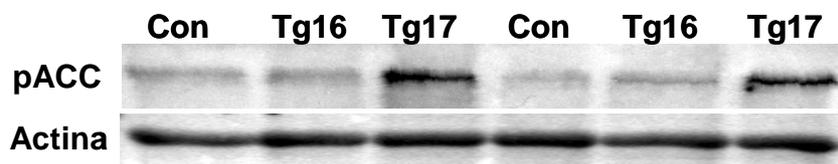


Figura 17. Niveles de fosforilación de la ACC. Análisis por Western blot del estado de fosforilación del enzima ACC. Se obtuvieron extractos de músculo esquelético de ratones controles (Con), transgénicos de la línea 16 (Tg16) y transgénicos de la línea 17 (Tg17) alimentados con dieta estándar de laboratorio. Las membranas se incubaron con un anticuerpo específico que detecta la forma fosforilada de la ACC. En la figura se muestra un Western blot representativo de los resultados obtenidos.

1.2.13. Expresión de CPT-1 en músculo esquelético.

Se analizaron también los niveles de expresión de la isoforma muscular de la carnitina palmitoil transferasa- 1 (CPT-1) en músculo esquelético. Esta proteína está implicada en el proceso de internalización de los ácidos grasos en la mitocondria para que puedan ser oxidados. El malonil-CoA es uno de los principales inhibidores fisiológicos de la expresión de CPT-1. Así pues, una disminución en la activación de ACC implica una menor síntesis de malonil-Coa, y por tanto, un posible aumento en la expresión de CPT-1. Se detectó que las líneas de transgénicos presentaban una mayor expresión de CPT-1 (Figura 18).



Figura 18. Niveles de expresión de CPT-1. Análisis mediante Northern blot de los niveles de expresión de CPT-1. Se extrajo RNA total de músculo esquelético de ratones controles (Con) y transgénicos de las líneas 16 (Tg16) y 17 (Tg17) alimentados con dieta estándar de laboratorio. En la figura se muestra un Northern blot hibridado con una sonda específica para CPT-1.

1.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE UNA DIETA ALTA EN LÍPIDOS EN ANIMALES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO.

La mayor predisposición a oxidar ácidos grasos detectada en el músculo esquelético de los animales transgénicos, determinada por una mayor activación de AMPK, una menor activación de ACC y un incremento en la expresión de CPT-1, sugerían que la expresión de adiponectina en este tejido protegería de la resistencia a la insulina y la obesidad inducida por una dieta alta en lípidos. Así pues, a continuación se estudió la respuesta de animales de tres meses de edad de las dos líneas de transgénicos a una alimentación con dieta alta en lípidos durante un periodo de 4 meses.

1.3.1. Evolución del peso corporal e ingesta de alimento.

Se evaluó si la expresión de adiponectina en músculo esquelético tenía algún efecto sobre la ganancia de peso inducida por la ingesta de dieta alta en lípidos. Con este fin, se realizó un seguimiento de la ganancia de peso corporal (Figura 19A). Dado que la experimentación con los animales durante la dieta alta en lípidos puede interferir con el peso corporal no se realizó ninguna manipulación a los ratones durante el primer mes y medio de la dieta. Durante este periodo se pudo observar como los animales transgénicos presentaban un incremento de peso inducido por la dieta un 10% superior al inducido en los animales controles. También se determinó la ingesta de alimento, no detectándose diferencias en la ingesta de alimento durante el periodo de dieta alta en lípidos (Figura 19B).

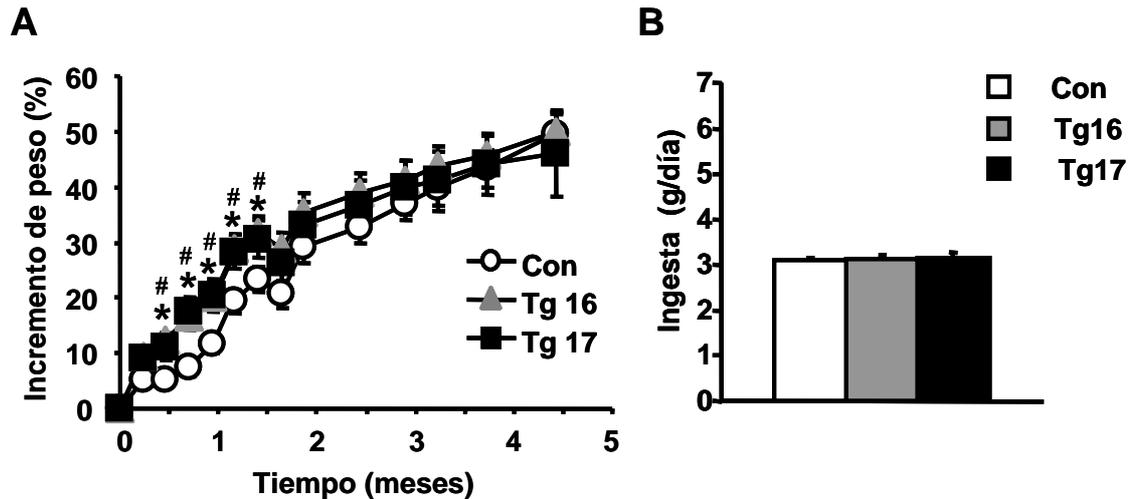


Figura 19. (A) Evolución del peso corporal. Ratones controles (Con) y transgénicos de las líneas 16 (Tg16) y 17 (Tg17) se alimentaron con una dieta alta en lípidos por un periodo de 4 meses. Su peso se determinó semanalmente. **(B) Ingesta de alimento.** Se pesó el alimento ingerido por estos mismos ratones. Los resultados están expresados como la media \pm S.E de 10 animales por grupo. # $p < 0.05$ Con vs Tg16; * $p < 0.05$ Con vs Tg17.

1.3.2. Análisis de la glucemia y la insulinemia.

Se hizo también un seguimiento de los valores de glucemia e insulinemia de los animales alimentados con dieta alta en lípidos. Se muestran los valores de glucemia e insulinemia en alimentación y ayuno al finalizar la dieta (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas en los valores de glucemia e insulinemia entre el grupo control y las líneas de transgénicos durante la dieta. No obstante, sí se detectó un aumento de la glucemia en ayuno y de la insulinemia en alimentación y ayuno de los animales alimentados con dieta alta en lípidos al compararlo con los valores obtenidos en animales alimentados con una dieta estándar (ver Tabla 1). Este aumento de la glucemia en ayuno y de la insulinemia es característico de esta dieta diabetogénica.

Tabla 2. Concentraciones de glucosa y de insulina en sangre

		Glucemia (mg/dL)	Insulinemia (ng/mL)
Alimentación	Control	151±7	4.97±0.67
	Tg16	168±12	3.75±0.65
	Tg17	170±15	3.77±0.63
Ayuno	Control	130±8	1.21±0.21
	Tg16	125±6	1.48±0.27
	Tg17	131±9	1.30±0.31

Los resultados están expresados como la media ± S.E. de 10 animales por grupo.

1.3.3. Análisis de la leptinemia.

Al finalizar la dieta, se determinaron los valores de leptina circulante en los animales transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos (Figura 20). Se observó un gran incremento de leptina circulante debido a la alimentación con dieta alta en lípidos respecto los animales alimentados con dieta estándar (ver Figura 12). También, se detectó que los animales de las dos líneas de transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos presentaban disminución en los niveles circulantes de leptina comparado con los controles también alimentados con una dieta alta en lípidos.

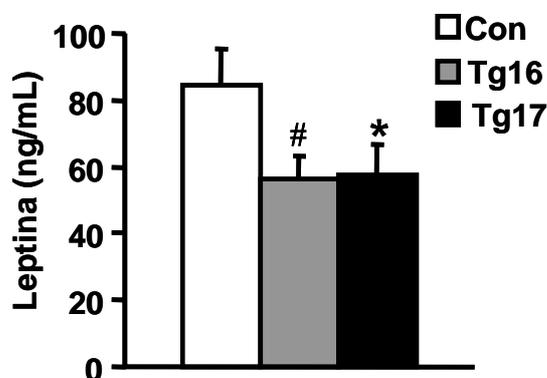


Figura 20. Leptina en alimentación con dieta alta en lípidos. Se analizó la concentración de leptina trascurridos 4 meses de dieta alta en lípidos. Los resultados están expresados como la media ± S.E. de 10 animales por grupo. # p<0.05 Con vs Tg16; *p<0.05 Con vs Tg17.

1.3.4. Test de tolerancia a la insulina.

Para comprobar si la expresión exógena de adiponectina en músculo esquelético sensibilizaba a la insulina en animales alimentados con dieta alta en lípidos se realizó un test de tolerancia a la insulina (Figura 21). Al comparar la sensibilidad a insulina de los animales controles alimentados con dieta estándar con los animales controles alimentados con dieta alta en lípidos se detectó un aumento de la resistencia a insulina característico de este tipo de dieta diabotogénica. A diferencia de lo que sucedía en dieta estándar, donde la expresión de adiponectina en músculo esquelético mejoraba la sensibilidad a insulina (ver Figura 7), en condiciones de alimentación con dieta alta en lípidos las dos líneas de transgénicos mostraron una mayor resistencia a insulina.

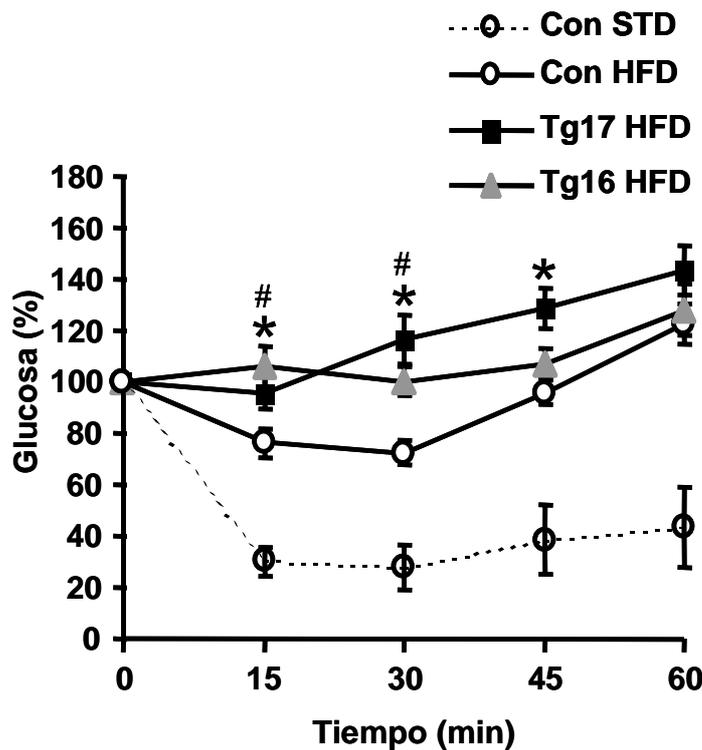


Figura 21. Test de tolerancia a la insulina. Porcentaje de disminución de la glucemia respecto al tiempo. Se inyectaron 0,75 UI de insulina/Kg a ratones alimentados con dieta alta en lípidos tanto controles (Con HFD) como transgénicos de las líneas 16 (Tg16 HFD) y la línea 17 (Tg17HFD) y a un grupo control alimentado con dieta estándar (Con STD). Se tomaron muestras de sangre por la vena caudal a los tiempos indicados y se determinó la glucemia tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 10 animales por grupo. # $p < 0.05$ Con vs Tg16; * $p < 0.05$ Con vs Tg17.

1.3.5. Test de tolerancia a la glucosa.

También se determinó la tolerancia a la glucosa en estos animales. Para ello, se realizó un test de tolerancia intraperitoneal a este azúcar (Figura 22). Se observó que la dieta alta en lípidos producía un aumento de la intolerancia a la glucosa, tanto en controles como en transgénicos, comparado con los valores obtenidos en los animales controles alimentados con dieta estándar. Esta intolerancia a la glucosa es característica de los animales alimentados con dieta alta en lípidos. El efecto de la sobrecarga de glucosa era similar en los tres grupos alimentados con esta dieta. Estos resultados indicaban que la expresión ectópica de adiponectina en músculo esquelético no mejoraba la resistencia a la glucosa inducida por una dieta alta en lípidos.

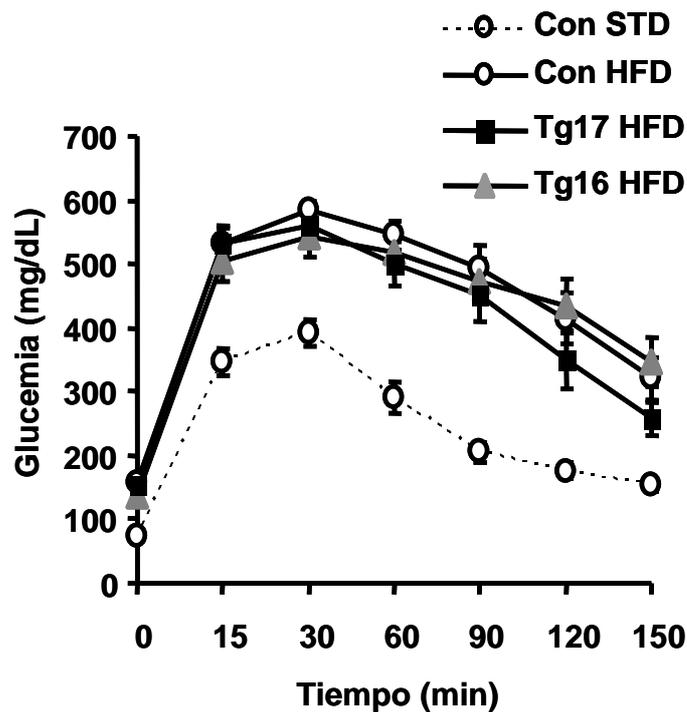


Figura 22. Test de tolerancia a la glucosa. Se realizó un test de tolerancia a la glucosa a ratones alimentados con dieta alta en lípidos tanto controles (Con HFD) como transgénicos de las líneas 16 (Tg16 HFD) y la línea 17 (Tg17 HFD) y un grupo control alimentado con dieta estándar ayunados durante 16 h. Se administraron 2 mg de glucosa por gramo de peso vivo y a continuación se realizaron determinaciones de la concentración de glucosa en sangre a lo largo del test, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 10 animales por grupo.

1.3.6. Niveles circulantes de adiponectina.

Se determinaron los niveles de adiponectina murina circulante para evaluar como afectaba la alimentación con dieta alta en lípidos a los niveles de esta hormona tanto en los animales controles como transgénicos. Se observó un incremento de los niveles séricos de adiponectina en los animales controles alimentados con dieta alta en lípidos (Figura 23). Este incremento de adiponectina circulante inducido por la dieta alta en lípidos era inferior en las líneas de animales transgénicos.

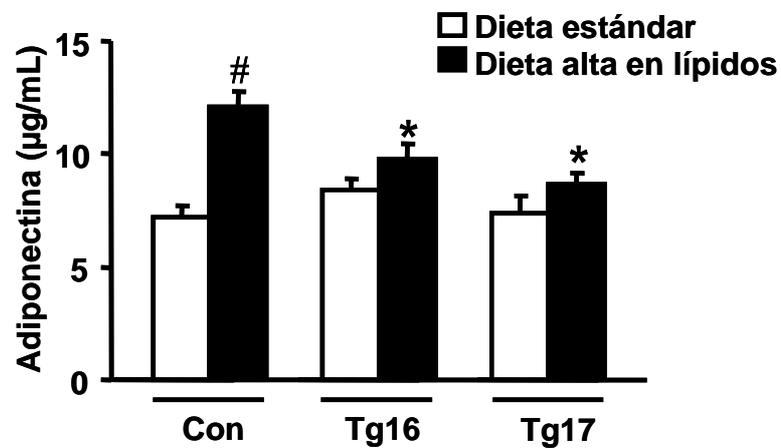


Figura 23. Niveles circulantes de adiponectina murina en animales alimentados con dieta alta en lípidos. Se obtuvo sangre de animales controles (Con), transgénicos de la línea 16 (Tg16) y transgénicos de la línea 17 (Tg17) alimentados durante 4 meses con una dieta alta en lípidos y se analizó la concentración de adiponectina. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 15 animales por grupo. * $p < 0.05$ control vs Tg16 o Tg17 alimentados con la misma dieta; # $p < 0.05$ dieta estándar vs dieta alta en lípidos para el mismo genotipo.

Así pues, en esta parte del trabajo se generó un modelo transgénico, MLC/Adpn, que expresaba adiponectina en músculo esquelético. Esta adiponectina actuaba a nivel local aumentando la sensibilidad a insulina en condiciones estándar de alimentación, probablemente debido a la activación de AMPK y a una mayor predisposición para la oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, este modelo animal no mostró una protección de la obesidad o de la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en lípidos.

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO MEDIANTE TRANSDUCCIÓN CON AAV-1.

A fin de evitar posibles efectos compensatorios que pudiesen tener lugar en los animales transgénicos debidos a que expresan el transgén durante todo su desarrollo se transfirió el gen de la adiponectina en músculo esquelético de animales adultos mediante virus adenoasociados. Para ello, se generaron virus adenoasociados AAV serotipo-1 (AAV-1) capaces de expresar adiponectina en músculo esquelético (AAV1/Adpn). Posteriormente, a animales controles de 3 meses de edad se les administraron intramuscularmente estos virus. Un grupo de estos animales se alimentó con dieta estándar y otro grupo se alimentó con dieta alta en lípidos por un periodo de tres meses.

2.1. Producción de AAV-1 con el gen quimérico CMV/Adpn.

En este caso, se utilizó adiponectina de ratón (Acrp30) en lugar de la adiponectina humana (apM1). De esta manera se pretendía evitar una posible respuesta autoinmune contra la adiponectina sintetizada que podría implicar la destrucción de las fibras musculares productoras. El cDNA de la adiponectina murina se obtuvo mediante RT-PCR a partir de mRNA de tejido adiposo blanco de ratones controles sanos utilizando cebadores específicos tal y como se describe en Materiales y Métodos. El cDNA de la adiponectina murina así obtenido se fusionó con el promotor del citomegalovirus (CMV) para formar el gen quimérico CMV/Adpn (Figura 24). Este promotor es un promotor fuerte que puede expresarse de manera ubicua. Este gen quimérico se encontraba en un plásmido específico para la producción de AAV-1 que nos permitiría la síntesis de partículas virales AAV1/Adpn

(Figura 24). Este serotipo viral tiene una alta eficiencia para transducir músculo esquelético (Chao et al., 2000).

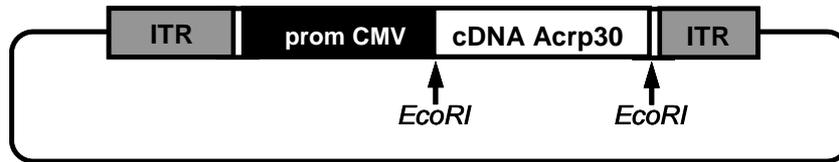


Figura 24. Representación del plásmido utilizado para la producción de los virus AAV1/Adpn formado por el gen quimérico CMV/Adpn flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) necesarias en el proceso de producción.

2.2. Análisis “in vitro” de la expresión de adiponectina mediante AAV-1.

Se comprobó la funcionalidad de los AAV-1 generados mediante infección en placa de células. Con este fin, células no adiposas de mamífero se incubaron en presencia de los virus AAV1/Adpn y dos días después de la infección se determinó la presencia de adiponectina en las células mediante inmunohistoquímica. Una vez fijadas las células se marcaron con anticuerpo específico contra la adiponectina murina. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con biotina. La señal se obtuvo con estreptavidina conjugada con un fluorocromo que emitía fluorescencia verde. Se observó que las células infectadas con AAV1/Adpn eran capaces de producir adiponectina murina dos días tras la infección (Figura 25). Esto nos demostraba que los virus eran funcionales y podían ser utilizados para el estudio *in vivo*.

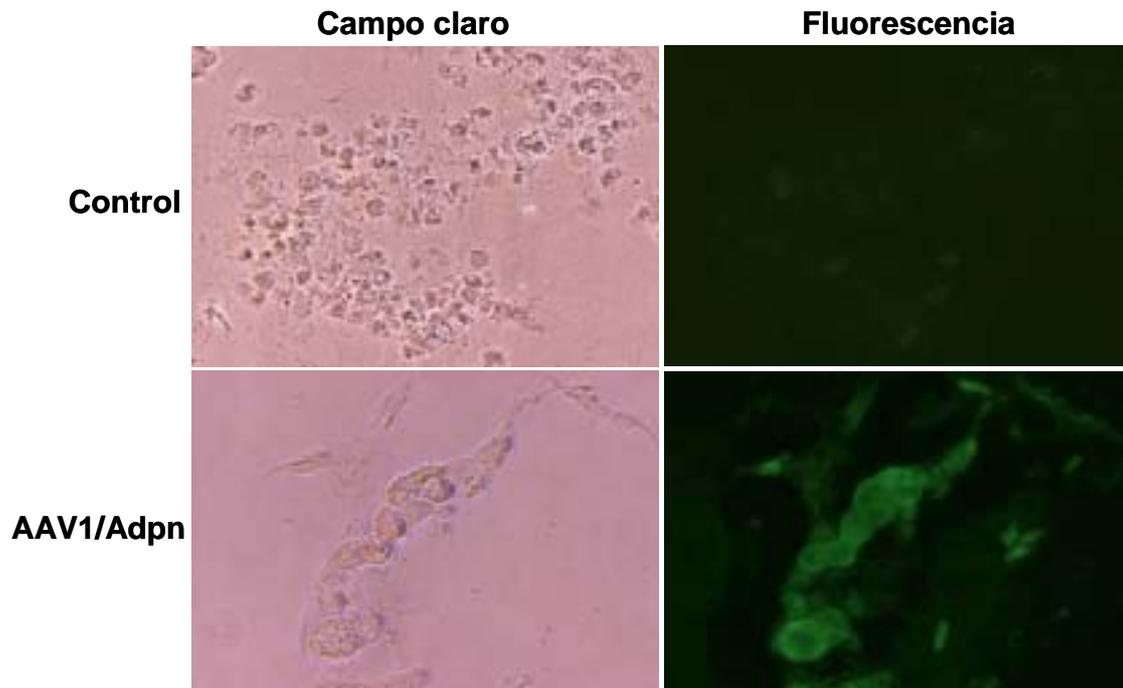


Figura 25. Inmunohistoquímica de células infectadas con AAV1/Adpn. Células HEK 293 fueron infectadas con virus AAV1/Adpn. La adiponectina murina se detectó 48 horas tras la infección mediante el marcaje con un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario biotinilado marcado con estreptavidina conjugada con el fluorocromo FITC.

2.3. Expresión de adiponectina en músculo mediante AAV-1.

A animales controles de 3 meses de edad se les administró, mediante inyección intramuscular, un título de 1×10^{10} partículas víricas AAV1/Adpn en cada uno de los músculos cuádriceps, gastrocnemio y tibialis de las dos extremidades posteriores. Un grupo de estos animales se alimentó con dieta estándar y otro grupo se alimentó con dieta alta en lípidos por un periodo de tres meses. Transcurrido este período de seguimiento de la dieta alta en lípidos, los animales se sacrificaron y se comprobó la expresión de adiponectina en los músculos transducidos con el virus. Con este fin, se obtuvo RNA total de los músculos tratados con AAV1/Adpn y se analizó la expresión de adiponectina murina mediante Northern blot. Los animales

transducidos con AAV1/Adpn mostraron expresión de adiponectina en el tejido muscular (Figura 26).



Figura 26. Expresión de adiponectina en músculo esquelético de ratones a los que se le había administrado AAV1/Adpn. Tres meses después de la administración en músculo esquelético de los AAV1/Adpn se obtuvo RNA total de este tejido (cuadriceps y gastrocnemio) de las extremidades posteriores. Las muestras se analizaron mediante Northern blot usando como sonda el cDNA de la adiponectina murina tal y como se explica en Materiales y Métodos.

También, se analizaron los niveles de adiponectina murina circulante al finalizar la dieta. De la misma manera que sucedía en los animales transgénicos, no se detectó un aumento en los niveles circulantes de adiponectina murina debido a la expresión de adiponectina en músculo esquelético mediante el virus AAV1/Adpn (Figura 27). Estos resultados indicaban que la adiponectina generada tampoco pasaba eficientemente a circulación y por tanto no podría ejercer efectos sistémicos. Así pues, al igual que sucedía en el modelo MLC/Adpn, los posibles efectos ejercidos por esta proteína en este modelo serían de origen autocrino/paracrino debido a su rápida interacción con los receptores de adiponectina presentes en el propio tejido productor. Se observó, que en este caso, la alimentación con dieta alta en lípidos producía una disminución de los niveles circulantes de adiponectina en el grupo control. Esta diferencia con respecto a los valores observados en el grupo control de la dieta anterior, en el que se detectó un incremento de adiponectina inducido por la dieta (ver Figura 23), puede ser debido al diferente fondo genético de los animales

utilizados, la duración de la dieta y la respuesta heterogénea de los animales a la dieta alta en lípidos que puede afectar a diferentes parámetros (Burcelin et al., 2002). De acuerdo con lo observado en el modelo transgénico MLC/Adpn, los animales que expresaban adiponectina en músculo esquelético mostraban niveles menores de adiponectina circulante después de la dieta.

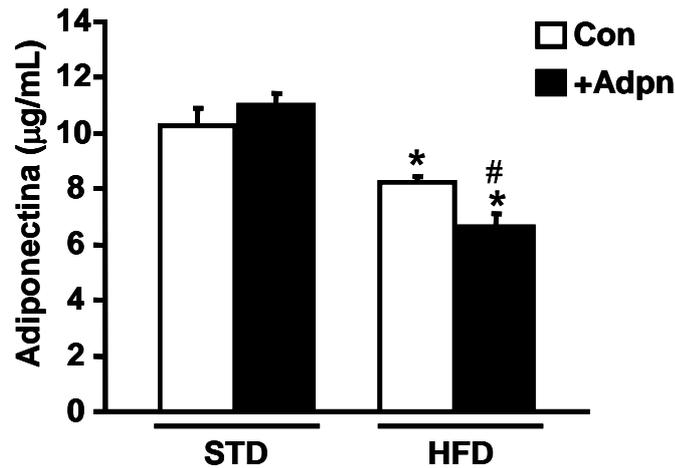


Figura 27. Niveles circulantes de adiponectina murina. Se obtuvo sangre de animales controles (Con) y de animales tratados con AAV1/Adpn (+Adpn) tanto alimentados con dieta estándar (STD) como alimentados con dieta alta en lípidos (HFD). Las muestras se analizaron mediante un ensayo RIA específico para detectar los niveles de adiponectina murina. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de los diferentes grupos (STD n=10; STD+Adp n=8; HFD n=9; HFD+Adp n=11). *p<0.05 dieta estándar vs dieta alta en lípidos para el mismo tratamiento. # p<0.05 control vs +Adpn alimentados con la misma dieta.

2.4. Evolución del peso corporal.

Ratones controles de tres meses de edad tratados con AAV1/Adpn se alimentaron durante 3 meses con dieta alta en lípidos. Otro grupo, a los que también se les había administrado AAV1/Adpn, se alimentó con dieta estándar. Durante este periodo se realizó un seguimiento del incremento de peso a lo largo del tiempo (Figura 28). Tal y como se observó en el modelo transgénico MLC/Adpn, la expresión de adiponectina en músculo esquelético no producía efectos sobre el peso en los animales alimentados con dieta estándar. Igual que en el transgénico (ver Figura 19A), los ratones que expresaban adiponectina en músculo esquelético

debido a la administración de AAV1/Adpn mostraron una mayor facilidad para ganar peso en dieta alta en lípidos. Este hecho, confirmaba lo observado en el modelo MLC/Adpn, indicando que la expresión de adiponectina en músculo esquelético no tenía un efecto protector del desarrollo de obesidad.

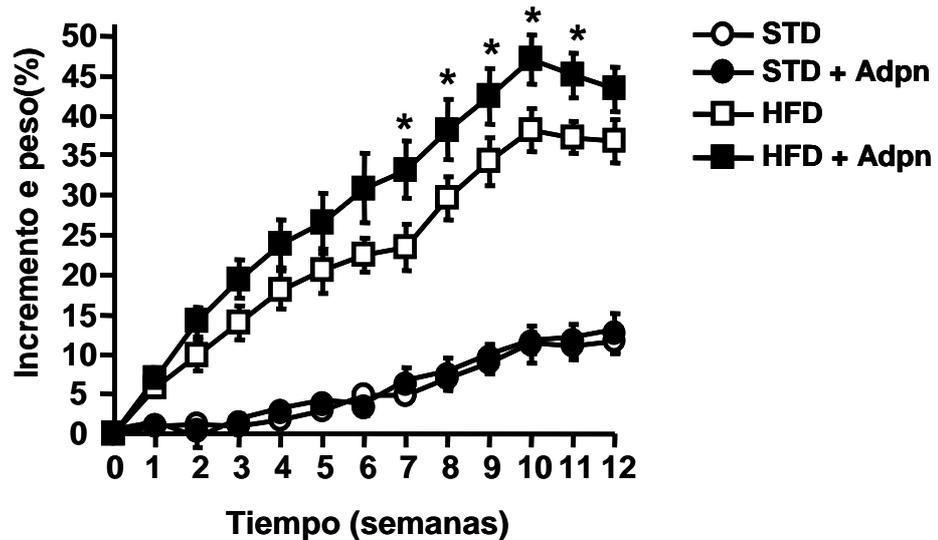


Figura 28. Evolución del peso corporal. Se llevó a cabo un seguimiento semanal del peso de los animales alimentados con dieta estándar que se habían tratado con AAV1/Adpn (STD+Adpn) y de los no tratados (STD). También se realizó un seguimiento de los animales alimentados con dieta alta en lípidos a los que se les había administrado AAV1/Adpn (HFD+Adpn) y de los no tratados alimentados con dieta alta en lípidos (HFD). Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de los diferentes grupos (STD n=10; STD+Adp n=8; HFD n=9; HFD+Adp n=11). *p<0.05 tratados con AAV1/Adpn vs controles en la misma dieta.

2.5. Análisis de la glucemia y la insulinemia.

Como se observó en el modelo transgénico MLC/Adpn, la expresión de adiponectina en músculo esquelético, esta vez mediante la transducción con virus AAV1/Adpn, no mejoraba los valores de glucemia e insulinemia en alimentación una vez finalizada la dieta (Tabla 3). Además, el incremento característico de la insulinemia debido a la ingestión de la dieta alta en lípidos confirmaba los efectos diabéticos de esta dieta (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de glucosa y de insulina en sangre

		Glucemia (mg/dL)	Insulinemia (ng/mL)
STD	Control	144 ± 4	1.39±0.14
	AAV1/Adpn	141 ± 5	1.50±0.30
HFD	Control	143 ± 3	5.21±0.76
	AAV1/Adpn	143 ± 4	5.40±0.26

2.6. Test de tolerancia a la insulina.

Para determinar como afectaba la expresión de adiponectina en el músculo esquelético a la sensibilidad a la insulina se realizó un test de tolerancia a esta hormona. Con este fin, se administró una dosis de 0,75 U/Kg a los animales de los diferentes grupos experimentales. Los ratones alimentados con dieta alta en lípidos mostraron un aumento significativo en la resistencia a la insulina inducido por esta dieta comparados con los animales controles alimentados con dieta estándar (Figura 29). No se observó una mejora en la sensibilidad a insulina debida a la expresión de adiponectina en músculo esquelético en las dos condiciones de alimentación estudiadas. Este hecho contrasta con la mayor sensibilidad a insulina observada en el modelo transgénico MLC/Adpn alimentado con dieta estándar (ver Figura 7). Hay que tener en cuenta que en el modelo MLC/Adpn es toda la masa de músculo esquelético corporal la que expresa adiponectina contribuyendo a la mejora en la sensibilidad a insulina observada. En cambio, en la transducción con virus AAV1/Adpn dicha expresión se reduce a la musculatura de las extremidades traseras.

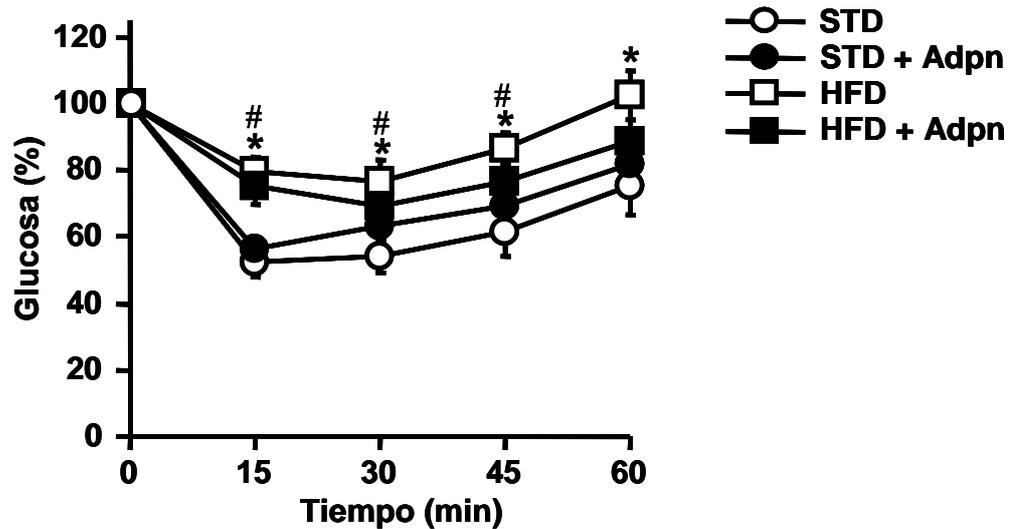


Figura 29. Test de tolerancia a la insulina. Porcentaje de disminución de la glucemia respecto al tiempo. Se inyectaron 0,75 UI de insulina por Kg de peso de ratón a ratones alimentados con dieta estándar (STD) y dieta alta en lípidos (HFD) y a ratones que expresaban adiponectina en músculo esquelético alimentados con dieta estándar (STD + Adpn) y dieta alta en lípidos (HFD + Adpn). Se tomaron muestras de sangre por la vena caudal a los tiempos indicados y se determinó la glucemia tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de los diferentes grupos (STD n=10; STD+Adp n=8; HFD n=9; HFD+Adp n=11). *p<0.05 HFD vs STD; # p<0.05 HFD+Adpn vs STD.

Así pues, la expresión de adiponectina en músculo esquelético mediante la transducción con virus AAV1/Adpn no protegía de la obesidad y de la resistencia a insulina inducida por una dieta alta en lípidos. Este hecho, acorde con lo observado en el modelo MLC/Adpn, indica que el efecto protector de la adiponectina frente a la obesidad y la resistencia a insulina no dependería exclusivamente de su actuación en músculo esquelético. Probablemente, también sea necesaria la actuación de la adiponectina en hígado para poder realizar el papel protector frente a la obesidad y la resistencia a la insulina descrito para esta hormona.

PARTE II:

**EFEECTO DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN
MÚSCULO ESQUELÉTICO EN UN MODELO DE
RESISTENCIA A INSULINA SIN OBESIDAD**

Aunque el incremento en músculo de la oxidación de lípidos se ha hipotetizado como el principal factor por el que la adiponectina conduce a la mejora en la sensibilidad a la insulina, en la primera parte del trabajo se observó que la mayor predisposición a oxidar ácidos grasos en el músculo esquelético, inducido por la expresión de adiponectina, no era suficiente para contrarrestar la resistencia a insulina inducida por una dieta alta en lípidos. Este hecho sugiere que el hígado es un órgano diana de la adiponectina imprescindible para el papel protector frente la obesidad y la resistencia a la insulina descrito para esta hormona.

Así pues, en la segunda parte del estudio se analizaron los efectos de la expresión de adiponectina en músculo en un modelo de resistencia primaria a la insulina. En este caso, la resistencia a insulina no era debida a la lipotoxicidad inducida por la ingesta de dieta alta en lípidos sino a un defecto en la señalización de insulina. Con este fin, se utilizaron animales genosuprimidos IRS-1^{-/-}. Los animales IRS-1^{-/-} presentan resistencia severa a insulina, alteración en la tolerancia a glucosa e hiperinsulinemia. El interés de este modelo consiste, en primer lugar, en que a pesar de ser resistentes a insulina los animales IRS-1^{-/-} no presentan obesidad. En segundo lugar, este modelo no presenta resistencia a insulina en hígado, ya que el aumento en la señalización vía IRS-2 compensa funcionalmente en este tejido la falta de IRS-1 (Yamauchi et al., 1996; Previs et al., 2000). Además, la utilización de este modelo permitió estudiar si los efectos de la adiponectina como sensibilizador de la insulina tenían lugar independientemente de la presencia de IRS-1, el principal sustrato del receptor de la insulina en músculo esquelético.

3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES DEFICIENTES EN IRS-1.

En esta segunda parte se analizó cual era el efecto de la expresión de adiponectina en una situación de resistencia a insulina no asociada a obesidad ni a dieta. Con este fin, en este estudio se utilizó el ratón genosuprimido o *knock-out* para el gen del sustrato del receptor de la insulina- 1 (IRS-1^{-/-}) como modelo de resistencia a la insulina. En este caso, se utilizó la electrotransferencia de DNA plasmídico como método de transferencia génica para conseguir expresar adiponectina en el músculo esquelético. Esta técnica es ampliamente utilizada en estudios de terapia génica ya que es una de las más eficaces para la transferencia no viral de genes a músculo esquelético.

3.1. Construcción del vector para electrotransferencia.

Se utilizó para expresar en músculo esquelético la adiponectina de origen murino (Acrp30) a fin de evitar una posible respuesta inmune contra la adiponectina producida y la destrucción de las fibras musculares productoras. La expresión de la adiponectina estaba controlada por el promotor del citomegalovirus (CMV). Este promotor permite una expresión fuerte de adiponectina en músculo esquelético. Con este fin, el cDNA de la adiponectina murina se ubicó bajo el control del promotor CMV en el plásmido que posteriormente se utilizó para la transferencia génica.

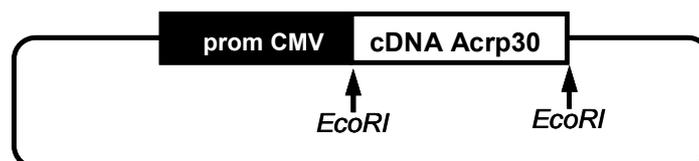


Figura 1. Representación del plásmido utilizado en la electrotransferencia que contiene el gen quimérico CMV/Adpn.

3.2. Expresión de adiponectina en músculo esquelético mediante electrotransferencia.

Los animales deficientes para IRS-1 se genotiparon mediante Southern blot. Se utilizaron animales no deficientes para IRS-1 como grupo control experimental. Tanto animales IRS-1^{-/-} como controles de tres meses de edad fueron electrotransferidos en el músculo con el plásmido pCMV/Adpn o el plásmido control pCMV/ β gal. Para ello, los ratones se anestesiaron y se inyectó hialuronidasa en los músculos cuádriceps, gastrocnemio y tibialis anterior de ambas extremidades traseras. Posteriormente, se inyectaron en dichos músculos 50 μ g del plásmido correspondiente resuspendido en solución salina. En total, 300 μ g de plásmido por animal. En este punto, se aplicaron 10 pulsos de 20 milisegundos de 175V por cm de diámetro de la extremidad y 2 Hz. Estas descargas eléctricas, no sólo permiten la formación de poros en la membrana de la célula muscular, electropermeabilidad, sino que dotan al DNA de motilidad electroforética facilitando la entrada de éste en la fibra muscular (Sotkauskas et al., 2002).

Tres semanas después de la electrotransferencia con el plásmido se analizó la expresión de adiponectina murina en el músculo esquelético de los animales electrotransferidos: animales controles electrotransferidos con el plásmido pCMV/ β gal o pCMV/Adpn y animales IRS-1^{-/-} electrotransferidos con el plásmido pCMV/ β gal o pCMV/Adpn. Se observó que los animales electrotransferidos en músculo con el plásmido pCMV/Adpn eran capaces de expresar niveles elevados de adiponectina en este tejido (Figura 2).

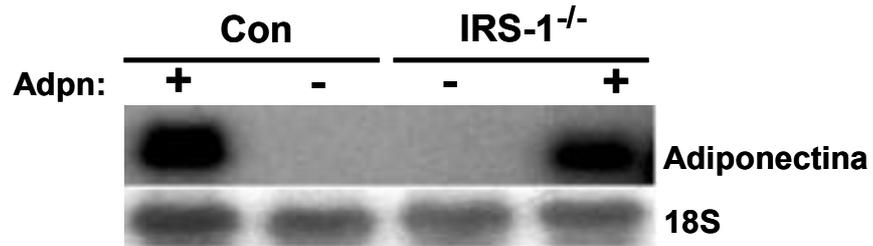


Figura 2. Expresión de adiponectina en el músculo esquelético de ratones IRS-1^{-/-}. Tres semanas después de la electrotransferencia se obtuvo RNA total a partir de músculo esquelético (cuadriceps y gastrocnemio) de las extremidades posteriores de animales controles (Con) e IRS-1^{-/-} electrotransferidos con el plásmido pCMV/Adpn. Las muestras se analizaron mediante Northern blot. La membrana se hibridó usando como sonda el cDNA de la adiponectina murina. La carga se normalizó por la cantidad de RNA de 18S, tal y como se explica en Materiales y Métodos.

3.3. Detección de la proteína adiponectina.

Una vez detectada la presencia de mRNA se analizó la presencia de la proteína adiponectina en extractos musculares. Con este fin, se obtuvieron extractos de proteína muscular y se analizó la presencia de proteína adiponectina mediante Western blot. Se detectó la presencia de adiponectina en el músculo de los animales electrotransferidos con el plásmido pCMV/Adpn (Figura 3).

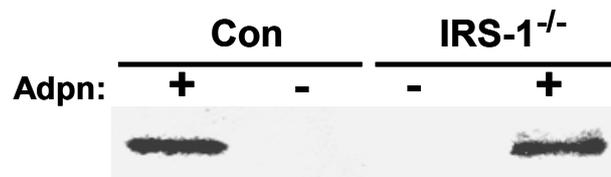


Figura 3. Detección de adiponectina en músculo esquelético de ratones IRS-1^{-/-}. Tres semanas después de la electrotransferencia se obtuvieron extractos proteicos de músculo esquelético (cuadriceps y gastrocnemio) de las extremidades posteriores de animales controles (Con) e IRS-1^{-/-} electrotransferidos con el plásmido pCMV/Adpn. Las muestras se analizaron mediante Western blot tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Para analizar si la adiponectina producida en músculo esquelético era secretada a la circulación se determinaron los niveles de adiponectina murina circulante tres semanas después de la electroporación. No se observaron cambios en estos niveles indicando que la proteína producida en músculo esquelético no pasaba a circulación (Figura 4). Además, los animales genosuprimidos mostraban una tendencia no significativa a presentar mayores niveles de adiponectina circulante respecto a los controles.

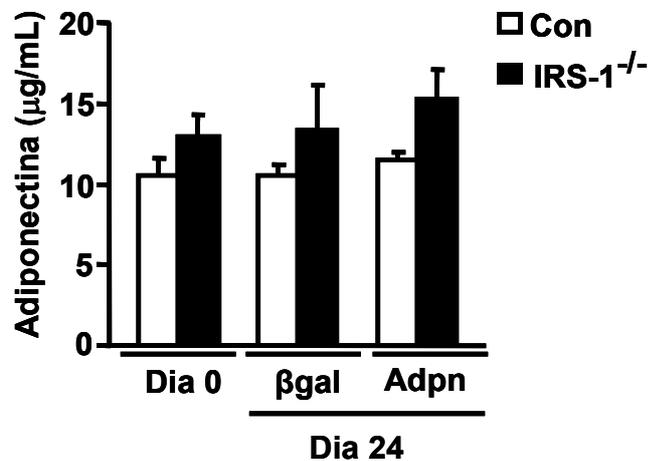


Figura 4. Niveles circulantes de adiponectina. Se obtuvo sangre de animales controles (Con) y genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) antes de la electrotransferencia (Día 0) y 3 semanas después de la electrotransferencia (Día 24) con el plásmido correspondiente (βgal o Adpn). Las muestras se analizaron mediante RIA específico para detectar adiponectina murina. Los resultados están expresados como la media ± S.E. de 10 animales por grupo.

3.4. Análisis de la glucemia y la insulinemia.

Se midieron los niveles de glucosa en sangre en condiciones de alimentación (24 días después de la electrotransferencia), y de ayuno (18 días después de la electrotransferencia) en los diferentes grupos experimentales. No se detectaron diferencias en los valores de glucemia antes de la electrotransferencia entre los animales controles y *knock-out* en condiciones de alimentación. Además, la expresión de adiponectina en músculo esquelético no afectaba a estos valores en

los animales controles y genosuprimidos (Figura 5A). Tampoco se encontraron diferencias significativas debidas al genotipo o a la expresión de adiponectina en músculo esquelético en condiciones de ayuno (Figura 5B).

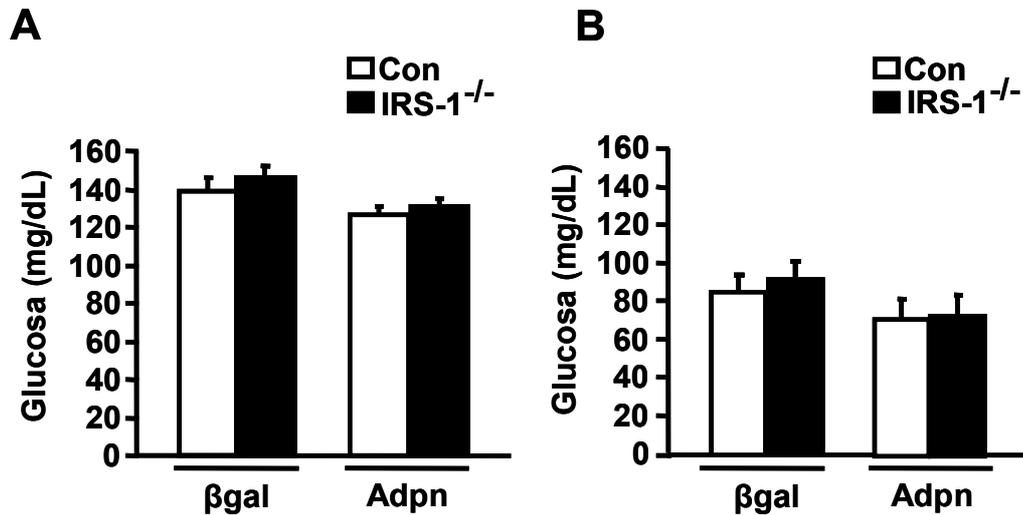


Figura 5. Análisis de la glucemia en alimentación (A) y en ayuno (B). Se determinó la glucemia en alimentación (A) y ayuno (B) de animales controles (Con) y genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las glucemias en alimentación se determinaron 3 semanas después de la electrotransferencia con el plásmido correspondiente (β gal o Adpn) y en ayuno 18 días después de la electrotransferencia. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 10 animales por grupo.

Se analizaron también los niveles de insulina circulantes. Los animales IRS-1^{-/-} mostraban valores elevados de insulina circulante característicos de este modelo de resistencia a insulina (Figura 6). Esta hiperinsulinemia se revirtió en un 40 % en los animales genosuprimidos que expresaban adiponectina en músculo esquelético.

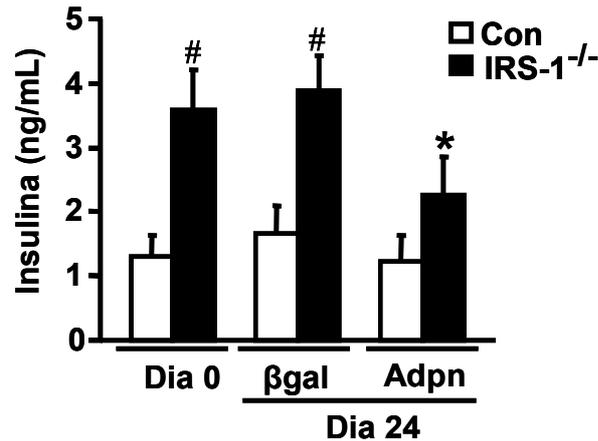


Figura 6. Análisis de la insulinemia. Se determinó la insulina sérica en alimentación de ratones controles (Con) y genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) antes de la electrotransferencia (día 0) y 3 semanas después de la electrotransferencia (Día 24) con el plásmido correspondiente (βgal o Adpn). Las muestras se analizaron tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media ± S.E. de 10 animales por grupo. * p<0.05 Adpn vs βgal en el mismo genotipo; # p<0.05 Con vs IRS-1^{-/-} con el mismo tratamiento.

3.5. Test de tolerancia a la insulina.

Para determinar si la expresión de adiponectina en músculo esquelético era capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina en este modelo se realizó un test de tolerancia a esta hormona. Con este fin, se administró una dosis de 0,75 UI/Kg a los animales de los diferentes grupos experimentales. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola a los tiempos indicados y se representaron los valores obtenidos como porcentaje de la glucosa respecto los niveles basales (Figura 7). Mientras los animales controles mostraron un descenso de prácticamente el 50% al administrar insulina, este descenso no llegó al 20% en los animales genosuprimidos. Este resultado confirmó que los animales IRS-1^{-/-} mostraban la resistencia a la insulina característica de este modelo. En cambio, los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en músculo esquelético mostraron una sensibilidad a la hormona a lo largo del test similar a la de los animales controles, indicando que la expresión de adiponectina en este tejido aumentaba la sensibilidad a insulina en este modelo de resistencia a esta hormona.

La expresión de adiponectina en músculo esquelético provocó un ligero aumento en la sensibilidad a la insulina en los animales controles aunque éste no era significativo. Estos resultados obtenidos indicaban que la expresión de adiponectina en músculo esquelético aumentaba de forma notable la sensibilidad a insulina en un modelo de resistencia primaria a insulina, en el cual, el desencadenante de esta resistencia no eran la obesidad ni la dieta.

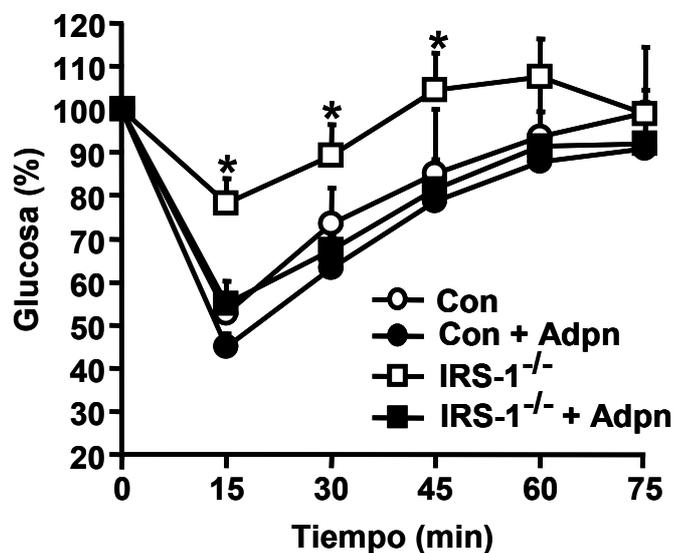


Figura 7. Test de tolerancia a la insulina. Porcentaje de disminución de la glucemia respecto al tiempo. Se inyectaron 0,75 UI de insulina por Kg de peso de ratón a ratones controles (Con), ratones controles que expresaban adiponectina en músculo esquelético (Con+Adpn), ratones genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) y ratones genosuprimidos que expresaban adiponectina en músculo esquelético (IRS-1^{-/-} + Adpn) el día 11 tras la electrotransferencia. Se tomaron muestras de sangre por la vena caudal a los tiempos indicados y se determinó la glucemia tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media ± S.E. de 10 animales por grupo. * p<0.05 Adpn vs βgal en el mismo genotipo.

3.6. Test de tolerancia a la glucosa.

Con el fin de determinar si la mejora en la sensibilidad a insulina en los animales IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en músculo esquelético se correspondía con un aumento en la capacidad de estos animales de compensar una sobrecarga de glucosa se realizó un test de tolerancia intraperitoneal a este azúcar. Para ello, se inyectaron dos gramos de glucosa por Kg de ratón y se determinaron los valores de glucemia de los diferentes grupos a lo largo del tiempo (Figura 8). No se observaron diferencias en los niveles basales de glucosa entre los diferentes grupos experimentales. Transcurridos 30 minutos de la inyección de glucosa, los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} presentaron un mayor incremento de la glucemia indicando intolerancia a la glucosa. En cambio, los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en músculo esquelético mostraron una tolerancia a la glucosa similar a los animales controles. La expresión de adiponectina en músculo esquelético de los animales controles generaba un ligero aumento en la tolerancia a la glucosa aunque este no era significativo. Los resultados obtenidos en el test de tolerancia a la glucosa indicaban que la expresión de adiponectina en músculo esquelético también podía aumentar la tolerancia a la glucosa en un modelo de resistencia primaria a insulina.

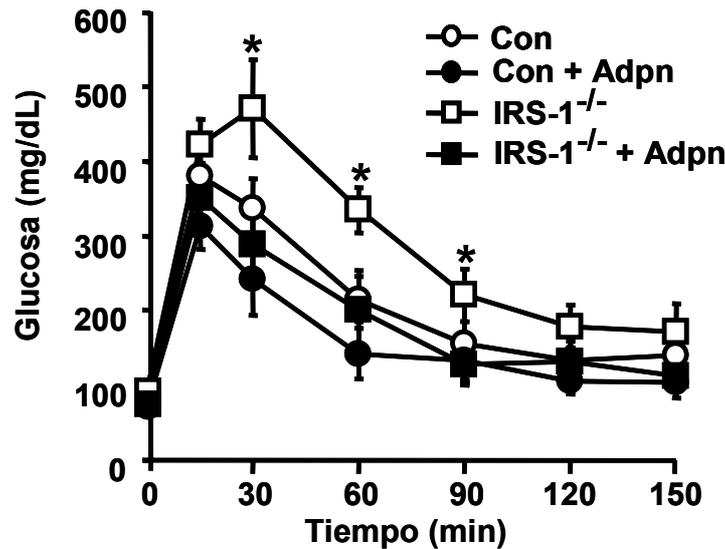


Figura 8. Test de tolerancia a la glucosa. Se realizó un test de tolerancia a la glucosa trascurridos 18 días tras la electrotransferencia a ratones controles (Con), ratones controles que expresaban adiponectina en músculo esquelético (Con+Adpn), ratones genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) y a ratones genosuprimidos que expresaban adiponectina en músculo esquelético (IRS-1^{-/-} + Adpn) previamente ayunados. Se administraron 2 mg de glucosa por gramo de peso vivo y a continuación se realizaron determinaciones de la concentración de glucosa en sangre a lo largo del test, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 10 animales por grupo. * $p < 0.05$ Adpn vs β gal en el mismo genotipo.

3.7. Captación de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo.

Dado que la expresión de adiponectina en músculo esquelético podía revertir la intolerancia a insulina y a glucosa en este modelo, se estudió si dicha expresión aumentaba la captación de glucosa en este tejido. Con este objetivo, tres semanas después de la electrotransferencia, los animales se inyectaron con 2-DG marcada con tritio, un análogo de la glucosa que puede ser captado y fosforilado pero no puede ser metabolizado más allá, quedando acumulado en forma de 2-deoxiglucosa-6-fosfato. El marcaje con tritio de la 2-DG permitió medir la cantidad de acumulada de esta molécula en los músculos gastrocnemio y cuádriceps y en tejido adiposo blanco. Los animales IRS-1^{-/-} mostraron una reducción del 35 % en la captación de glucosa en el gastrocnemio y del 40 % en cuádriceps comparado con los animales controles en ambos músculos estudiados (Figura 9). En cambio, la

expresión de adiponectina a nivel muscular en los animales IRS-1^{-/-} incrementó la captación de glucosa en ambos músculos estudiados, presentando niveles de captación similar al de los animales controles sanos. En los animales controles, no se observó un incremento significativo en la captación de glucosa debido a la expresión de adiponectina en el músculo esquelético. Los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} mostraron un incremento de cinco veces en la captación de glucosa a nivel de tejido adiposo comparado con los controles sanos. En cambio, los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en el músculo esquelético mostraron una reducción del 65 % en la captación de glucosa en este tejido. Estos resultados indicaban que la expresión de adiponectina en músculo esquelético normalizaba la captación de glucosa a nivel muscular, normalizando también la captación del tejido adiposo en este modelo de resistencia a insulina.

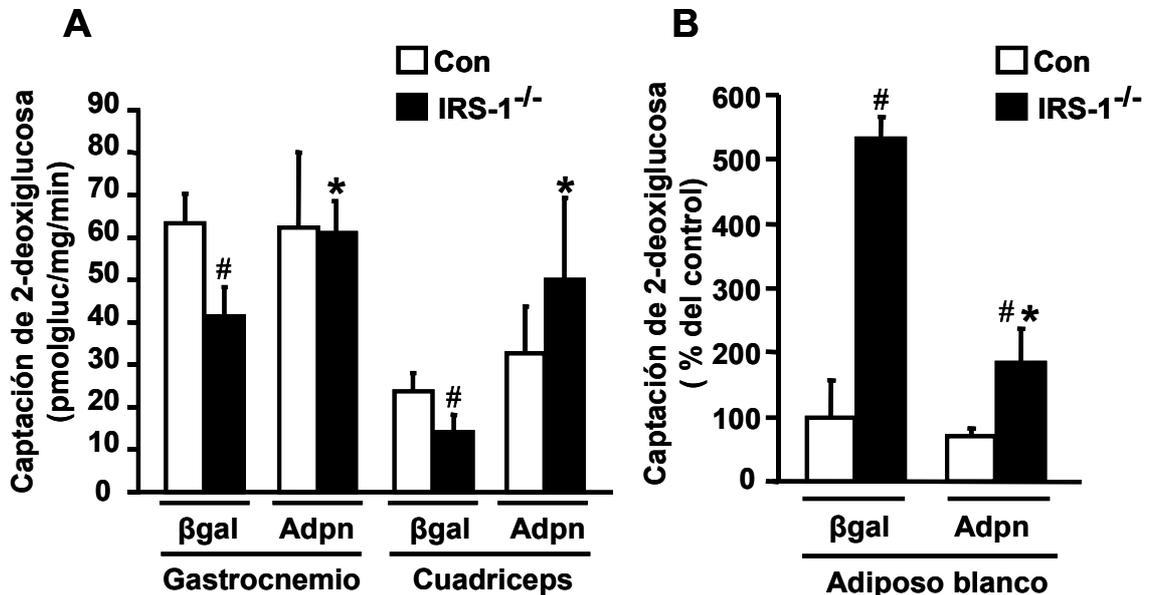


Figura 9. Captación de glucosa. Se determinaron los niveles de captación basal de glucosa en los músculo gastrocnemio y cuadriceps y en tejido adiposo blanco de ratones controles (Con) y genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) 24 días después de la electrotransferencia con el plásmido correspondiente (βgal o Adpn). Los resultados están expresados como la media ± S.E de 4 animales por grupo. * p<0.05 Adpn vs βgal en el mismo genotipo; # p<0.05 Con vs IRS-1^{-/-} con el mismo tratamiento.

3.8. Almacenamiento y utilización de la glucosa en músculo esquelético.

Con el objetivo de analizar como afectaba la expresión de adiponectina en músculo esquelético al almacenamiento y la utilización de la glucosa en este tejido se analizaron los niveles de metabolitos implicados en este proceso. Así pues, se determinaron los niveles de glucosa-6-fosfato y de glucógeno en músculo esquelético transcurridos dos semanas desde la electrotransferencia. Los animales IRS-1^{-/-} presentaron menores niveles de glucosa-6-fosfato y glucógeno comparado con los animales controles (Tabla 1). En cambio, los animales IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en músculo esquelético presentaron niveles normalizados de estos metabolitos. No se observaron cambios significativos en estos metabolitos debidos a la expresión de adiponectina en músculo esquelético de los animales controles. Estos resultados indicaban que la expresión de adiponectina en músculo esquelético normalizaba el almacenamiento y la utilización de glucosa en este tejido como consecuencia de una mejora en la sensibilidad a insulina y la captación de glucosa.

Tabla 1. Almacenamiento y utilización de glucosa

	Glucosa-6-P (μmol/g músculo)	Glucógeno (mg/g músculo)
Con	3.16 \pm 0.04	3.08 \pm 0.04
Con+Adpn	3.11 \pm 0.04	2.99 \pm 0.08
IRS-1^{-/-}	2.27 \pm 0.04 #	1.05 \pm 0.22 #
IRS-1^{-/-} + Adpn	2.68 \pm 0.13 *	3.52 \pm 0.51 *

Dos semanas después de la electrotransferencia se determinaron los niveles de glucosa-6-P y de glucógeno en animales controles (Con) y genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) que expresaban o no adiponectina en músculo esquelético tal y como se explica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E. de 5 animales por grupo. * p<0.05 Adpn vs β gal en el mismo genotipo; # p<0.05 Con vs IRS-1^{-/-} con el mismo tratamiento.

3.9. Efecto de la expresión de adiponectina en los niveles de fosforilación de IRS-2.

Para estudiar si los efectos observados en los animales deficientes para IRS-1 debidos a la expresión de adiponectina en músculo esquelético eran consecuencia de una mejora en la señalización propia de la insulina, se analizaron los niveles de fosforilación del sustrato del receptor de la insulina-2 (IRS-2). Para estas determinaciones los animales se sacrificaron dos semanas después de la electrotransferencia y se obtuvieron extractos proteicos. A nivel basal no se encontraron cambios en los niveles de fosforilación de IRS-2 en los animales controles ni en los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en el músculo esquelético (Figura 10). Al estimular con insulina, la expresión de adiponectina favorecía la fosforilación de IRS-2 en los animales controles. Los animales IRS-1^{-/-} presentaron una mayor fosforilación de IRS-2 estimulada por insulina como mecanismo compensatorio por la falta de IRS-1 característico de este modelo (Figura 10). En cambio, los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en el músculo esquelético no mostraron esta fosforilación compensatoria de IRS-2. Estos resultados indicaban que la expresión de adiponectina en músculo esquelético podía afectar a los niveles de fosforilación de IRS-2. En el caso de los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-}, la expresión de adiponectina en el músculo esquelético provocaba una normalización en la fosforilación de IRS-2.

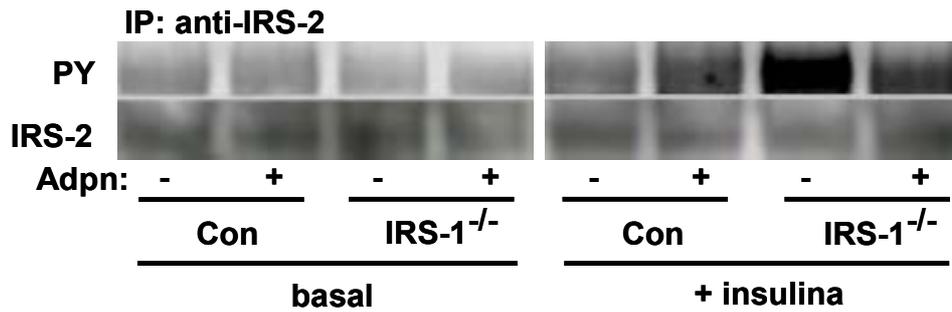


Figura 10. Fosforilación de IRS-2. Se determinó la fosforilación de IRS-2 en animales que expresaban adiponectina en músculo esquelético. Para ello, extractos musculares de animales controles (Con) y genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) estimulados (+ insulina) y sin estimular con insulina (basal) se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-IRS-2 tal y como se describe en Materiales y Métodos. Se determinó la fosforilación de IRS-2 en estos extractos con un anticuerpo anti-fosfotirosina (PY). La cantidad total de IRS-2 se determinó con el anticuerpo anti-IRS-2 (IRS-2).

3.10. Efecto de la adiponectina en la asociación estimulada por insulina de p85 con IRS-2.

La fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3-K) es uno de los principales efectores de la vía de señalización de insulina. La subunidad p85 α es la subunidad reguladora de PI3-K. Se determinaron los niveles de asociación de p85 α con IRS-2 en animales estimulados con insulina (Figura 11). Los animales controles que expresaban adiponectina en músculo esquelético mostraron una mayor asociación de IRS-2 con p85 α de acuerdo con los mayores niveles de fosforilación de IRS-2 que presentaron. Los animales IRS-1^{-/-} presentaron una mayor asociación de IRS-2 con p85 α comparado con los animales controles, acorde con los niveles de fosforilación de IRS-2. La expresión de adiponectina en músculo esquelético en estos animales producía una disminución en la asociación de p85 α estimulada por insulina mostrando niveles de asociación similares a los de los animales controles. Estos resultados indicaban que la expresión de adiponectina en músculo esquelético de los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} provocaba una normalización en la

señalización de insulina mediada por IRS-2 en este tejido. De esta manera, los efectos observados de mejora a la sensibilidad a insulina no eran debidos a un aumento en la señalización de la insulina vía IRS-2. Al contrario, de alguna manera la expresión de adiponectina en músculo esquelético hacía que el mecanismo compensatorio a través de IRS-2 propio de este modelo no estuviese activado.

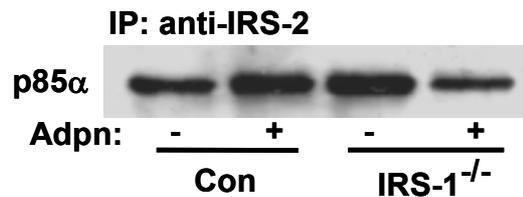


Figura 11. Asociación de p85α con IRS-2 estimulada por insulina. Se determinó la asociación de p85α con IRS-2 en animales que expresaban adiponectina en músculo esquelético. Para ello, extractos musculares de animales controles (Con) y genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) estimulados con insulina se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-IRS-2 tal y como se describe en Materiales y Métodos. En estos extractos se detectó la presencia de p85α con un anticuerpo específico para esta proteína.

3.11. Efecto sobre la fosforilación de Akt.

La quinasa Akt, también conocida como PKB, es una de los mediadores de la respuesta a insulina. La Akt se activa cuando la serina 473 es fosforilada. Esta activación es llevada a cabo por PI3-K. Se determinaron los niveles de fosforilación de Akt en extractos musculares. No se observaron cambios en los niveles de fosforilación de esta proteína debidos a la deficiencia en IRS-1 (Figura 12). Tampoco se observaron diferencias en el estado de fosforilación de Akt debido a la expresión de adiponectina en músculo esquelético.

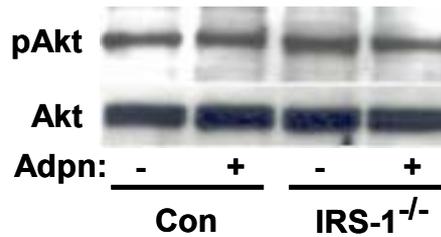


Figura 12. Activación de Akt. Se determinaron los niveles de fosforilación de Akt en extractos musculares de animales controles (Con) y genosuprimidos ($IRS-1^{-/-}$) que expresaban adiponectina en músculo esquelético. Se utilizaron anticuerpos específicos para detectar la forma fosforilada de Akt (pAkt) y la forma total (Akt) tal y como se explica en Materiales y Métodos.

3.12. Determinación del estado de activación de AMPK.

A partir de extractos musculares se determinaron los niveles de fosforilación de la AMPK. Los animales $IRS-1^{-/-}$ mostraron una mayor activación de la AMPK en músculo esquelético comparado con los animales controles. Se observó que la expresión de adiponectina en el músculo esquelético activaba, aunque levemente, la fosforilación de AMPK dos semanas después de la electrotransferencia (Figura 13). Esta activación era más acusada en los genosuprimidos $IRS-1^{-/-}$ que expresaban adiponectina en tejido muscular.

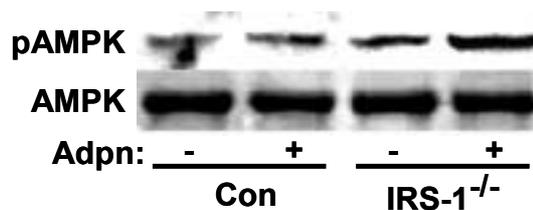


Figura 13. Activación de AMPK. Se determinaron los niveles de fosforilación de AMPK en extractos musculares de animales controles (Con) y genosuprimidos ($IRS-1^{-/-}$) que expresaban adiponectina en músculo esquelético. Para ello, se utilizaron anticuerpos específicos para detectar la forma fosforilada de AMPK α (pAMPK) y la forma total (AMPK) tal y como se explica en Materiales y Métodos.

3.13. Determinación del estado de activación de ACC.

Una de las enzimas sobre las que puede actuar la AMPK es la ACC. La ACC es la principal enzima implicada en la síntesis de malonil-CoA. El malonil-CoA es uno de los principales inhibidores de la β -oxidación de ácidos grasos. Los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} presentaron un incremento en la fosforilación de ACC comparado con los animales controles. Por tanto, los animales IRS-1^{-/-} presentaban un mayor estado de inactivación de la enzima ACC indicando una mayor disponibilidad para oxidar ácidos grasos. Paradójicamente, la expresión de adiponectina en músculo esquelético en los animales IRS-1^{-/-} producía un descenso en la fosforilación de la enzima ACC indicando un mayor estado de activación de esta enzima en estos animales y, por tanto, una menor predisposición a oxidar ácidos grasos. Probablemente, este hecho sea debido a la normalización en la disponibilidad de glucosa observada (Figura 14).

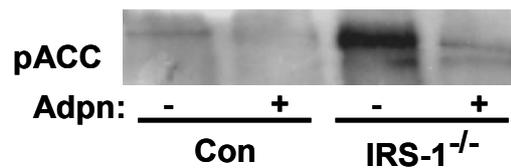


Figura 14. Activación de ACC. Se determinaron los niveles de fosforilación de ACC en extractos musculares de animales controles (Con) y genosuprimidos (IRS-1^{-/-}) que expresaban adiponectina en músculo esquelético. Se utilizó un anticuerpo específico para detectar la forma fosforilada de ACC (pACC) tal y como se explica en Materiales y Métodos.

3.14. Expresión génica en músculo esquelético.

A continuación, se analizó la expresión de diferentes genes relacionados con el metabolismo lipídico en el músculo esquelético. La isoforma muscular de la carnitina palmitoil transferasa-1 (mCPT-1) está implicada en el proceso de internalización de los ácidos grasos en la mitocondria para que puedan ser oxidados. Los animales IRS-1^{-/-} mostraron una tendencia a expresar más CPT-1 con respecto los animales controles indicando una mayor susceptibilidad para oxidar ácidos grasos en el tejido muscular. En cambio, los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en el músculo esquelético presentaron niveles de expresión de CPT-1 similares a los controles sanos indicando que la expresión de adiponectina producía una disminución de la expresión de CPT-1, y por tanto, en la predisposición para oxidar ácidos grasos en estos animales. Sin embargo, la expresión de adiponectina en músculo esquelético de animales controles sanos inducía la expresión de CPT-1 predisponiendo a una mayor oxidación de ácidos grasos (Figura 15A).

La malonil-CoA decarboxilasa (MCD) es una enzima implicada en la síntesis de acetil-CoA a partir de malonil-CoA. De esta manera, contribuye a una disminución en los niveles de malonil-CoA favoreciendo la oxidación de ácidos grasos. La expresión de MCD se encontraba aumentada en los animales IRS-1^{-/-} comparada con la expresión de los animales control indicando una mayor disponibilidad para oxidar ácidos grasos. En animales IRS-1^{-/-} la expresión de adiponectina aumentaba la expresión de MCD. Además, en animales controles la expresión de adiponectina

en músculo esquelético también aumentaba los niveles de expresión de MCD induciendo una mayor predisposición a oxidar ácidos grasos (Figura 15B).

El receptor alfa activador de la proliferación de los peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*, PPAR α) es un factor de transcripción que promueve la síntesis de enzimas implicados en la oxidación de ácidos grasos. No se encontraron diferencias de expresión de PPAR α entre animales IRS-1^{-/-} y animales controles. Los animales IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en músculo esquelético mostraron una tendencia clara a expresar más PPAR α (Figura 15C).

El receptor gamma activador de la proliferación de los peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR γ) a pesar de estar poco representado en el músculo esquelético, es importante para el mantenimiento de una adiposidad y de una sensibilidad a insulina normales a través del control de la expresión de genes relacionados con el aumento del metabolismo de los ácidos grasos (Hevener et al., 2003; Norris et al., 2003). Los animales IRS-1^{-/-} mostraron niveles similares de expresión de PPAR γ a los animales controles. En cambio, los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} que expresaban adiponectina en el músculo esquelético presentaron una disminución en los niveles de expresión de PPAR γ . La expresión de adiponectina en músculo esquelético de animales controles sanos inducía la expresión de PPAR γ aunque no de forma significativa. (Figura 15D).

La proteína transportadora de ácidos grasos- 1 (*Fatty Acid Transport Protein-1*, FATP-1) es una acil-coA sintetasa altamente expresada en músculo y que modula la captación de ácidos grasos y el metabolismo convirtiendo los ácidos grasos en

acil-CoA. Los animales IRS-1^{-/-} mostraron un menor nivel de expresión de FATP-1. La expresión de adiponectina en animales controles aumentaba la expresión de FATP-1 indicando una mayor tendencia a oxidar ácidos grasos. No se observaron cambios en la expresión de FATP-1 en los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} (Figura 15E).

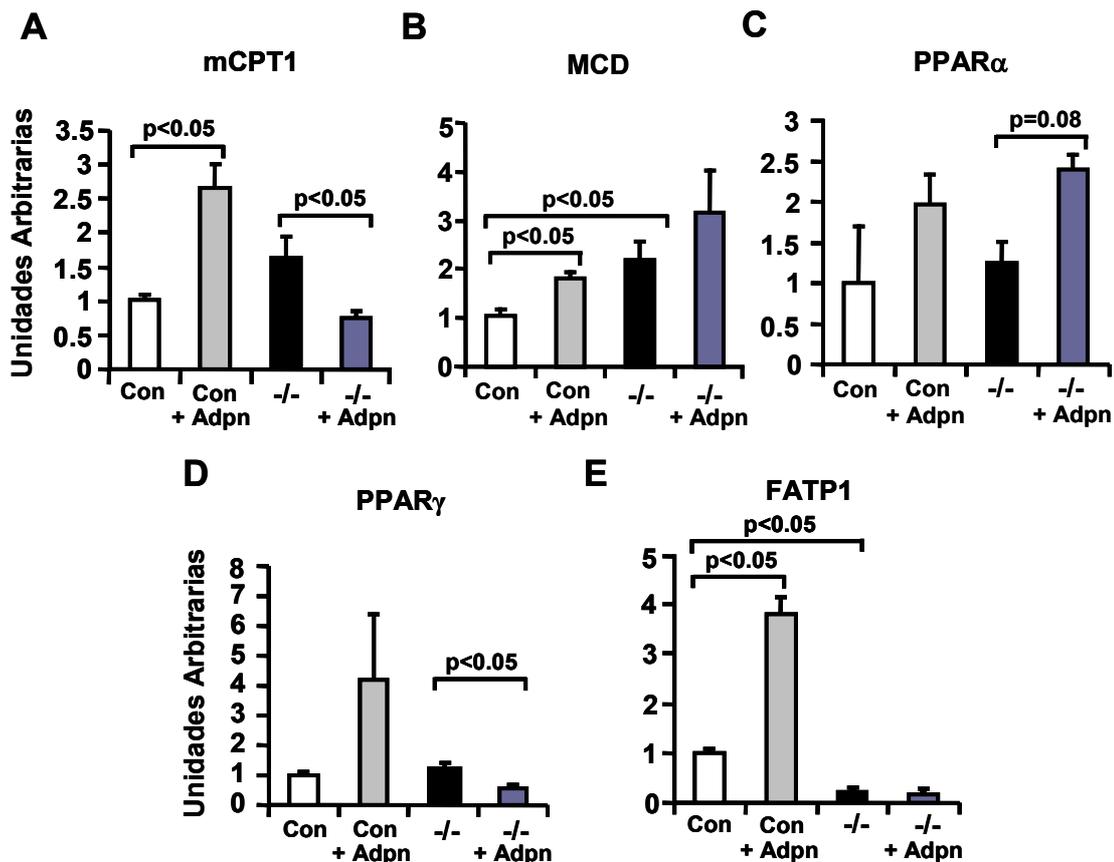


Figura 15. Expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en músculo esquelético. Se determinaron los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en músculo esquelético de animales controles (Con) y genosuprimidos (-/-) que expresaban adiponectina en músculo esquelético (+ Adpn). Los valores obtenidos se representan en relación al valor obtenido en los animales control tal y como se explica en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como la media \pm S.E de 3 animales por grupo.

Así pues, en esta segunda parte del trabajo se observó que la expresión de adiponectina en músculo esquelético mejoraba la sensibilidad a insulina en un modelo de resistencia a insulina sin obesidad. La mejora en la sensibilidad a insulina en este modelo era debida a una mejora en la captación de glucosa y a una

normalización en el metabolismo de la glucosa y no a un aumento en la oxidación de ácidos grasos en estos animales. De hecho, la mejora en la disponibilidad de glucosa en los animales IRS-1^{-/-} inducida por la expresión de adiponectina en músculo normalizaba la mayor susceptibilidad a oxidar ácidos grasos presente en el músculo de estos animales. De manera similar a lo que sucedía en los animales MLC/Adpn, se observó en animales controles sanos que la expresión de adiponectina en el músculo esquelético mediante electrotransferencia aumentaba la activación de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, este hecho no inducía una mejora significativa en la sensibilidad a insulina o la captación de glucosa en estos animales controles.

V. DISCUSIÓN

La diabetes tipo 2 está alcanzando niveles epidémicos en los países desarrollados y en los que están en vías de desarrollo (Zimmet et al., 2001). La diabetes tipo 2 se caracteriza por la aparición de resistencia a la insulina (DeFronzo et al., 1992;DeFronzo, 2004). El conocimiento de los mecanismos que llevan a esta resistencia y al mantenimiento de la enfermedad así como la descripción de posibles dianas terapéuticas es de vital importancia para el control de esta epidemia. En este contexto, el descubrimiento de la adiponectina aporta nuevas aproximaciones a los fenómenos que subyacen al desarrollo de la enfermedad. Desde el año 1995, fecha de la primera descripción de la existencia de esta proteína, hasta inicios del 2001 se conocía poco sobre esta proteína. Prácticamente, los datos que se tenían eran los relacionados con su estructura (Scherer et al., 1995;Shapiro and Scherer, 1998) y con su asociación negativa con la obesidad (Hu et al., 1996;Arita et al., 1999), la diabetes tipo 2 (Hotta et al., 2000) y el desarrollo de patologías vasculares (Ouchi et al., 1999;Okamoto et al., 2000;Yokota et al., 2000). Fue en el año 2001, a partir de la publicación de los efectos de la adiponectina en hígado y músculo (Berg et al., 2001;Fruebis et al., 2001;Yamauchi et al., 2001), cuando la adiponectina comenzó a ser más estudiada en este área. La manera en que la adiponectina ejerce efectos fisiológicos está aún por esclarecer. En primer lugar, hay que concretar qué formas de la adiponectina pueden interactuar y de qué manera en los diferentes tejidos. También se desconoce qué papel desarrolla cada tejido, en especial el músculo y el hígado, en los efectos beneficiosos de la adiponectina a nivel sistémico en la sensibilidad a insulina y la protección de la obesidad.

La primera parte del presente estudio se centró en la generación y caracterización de un modelo transgénico que permitiese expresar adiponectina en músculo esquelético. No obstante, ya existían varios modelos transgénicos para estudiar los efectos de la hiperadiponectinemia circulante a nivel sistémico. En ellos se sobreexpresaba adiponectina en tejido adiposo (Pajvani et al., 2003;Combs et al., 2004) o hígado (Yamauchi et al., 2003b). En los dos primeros modelos, se inducían diferentes mutaciones en el dominio colágeno de la adiponectina que permitían la hipersecreción de esta proteína por el tejido adiposo. En el tercer modelo, se sobreexpresaba el dominio globular de la adiponectina en hígado. Todos estos modelos permitieron el estudio de los efectos protectores de la adiponectina a nivel sistémico ya que todos presentaban hiperadiponectinemia circulante. A diferencia de los casos citados anteriormente, el modelo transgénico descrito en la presente tesis doctoral, MLC/Adpn, expresa adiponectina en músculo esquelético sin aumento de la adiponectinemia circulante. Así pues, este modelo permitía describir cual era la contribución de la acción de la adiponectina en músculo esquelético en relación a la sensibilidad a insulina y la obesidad. La expresión específica de adiponectina en músculo esquelético se consiguió mediante la construcción de un gen quimérico en el que se expresaba adiponectina humana bajo el control del promotor MLC, específico de músculo esquelético, y su posterior microinyección en oocitos fecundados de ratón. Se ha comprobado que el transgén se ha integrado en el genoma en dos líneas animales y que ambas líneas son capaces de producir adiponectina en las fibras musculares. El presente modelo transgénico, al sobreexpresar adiponectina humana, permite diferenciar con facilidad la expresión propia del tejido adiposo del ratón de aquella producida por el transgén. La adiponectina producida en el músculo esquelético de estos animales no pasa a

circulación, seguramente debido a que una vez secretada interacciona directamente con los receptores de esta hormona presentes en el músculo. Como se ha descrito, incrementar los niveles circulantes de adiponectina en un modelo transgénico es complicado. Esto es debido a los ya de por sí elevados niveles circulantes de esta proteína, su corta vida media, la inhibición de la secreción endógena y a las características de su secreción (Combs et al., 2004). De esta manera, los efectos observados de la expresión de adiponectina en el músculo esquelético son debidos a efectos autocrinos y paracrinos de esta hormona en el propio tejido productor. Además, esta expresión en músculo no afecta a la producción en tejido adiposo a juzgar por la presencia de unos niveles normales de adiponectina murina en este modelo. Así pues, el fenotipo observado es debido a la actuación de la adiponectina exclusivamente en músculo esquelético y no a la actuación de ésta en hígado.

En animales jóvenes del modelo transgénico MLC/Adpn no se observó una disminución en los niveles de glucosa y de insulina debido a la producción de la adiponectina, flAdpn , en músculo esquelético. Acorde con estos datos, animales transgénicos que sobreexpresan flAdpn a nivel circulante no presentan diferencias en la glucemia en alimentación y ayuno (Combs et al., 2004). De la misma manera, la administración exógena de flAdpn no afecta a los niveles de glucemia ni de insulinemia (Fruebis et al., 2001). Estos resultados contrastan con otro trabajo en que la administración exógena aguda de flAdpn en animales controles C57Bl/6J sí produce una disminución puntual en los valores de glucosa sin alterar los valores de insulinemia (Berg et al., 2001).

Al realizar un test de tolerancia a la insulina, los animales transgénicos MLC/Adpn de la línea 17 presentan una mayor sensibilidad a la insulina. En cambio, no se detectó un aumento en la tolerancia a la glucosa en estos animales. De acuerdo con estos resultados, en otros trabajos anteriores, animales que expresan en hígado fIAdpn a nivel circulante presentan un test de tolerancia a la insulina mejorado, y al igual que en el modelo MLC/Adpn, no presentan mejora en el test de tolerancia a la glucosa (Sato et al., 2005). Así pues, la mejora en la sensibilidad a insulina debida a la expresión local de fIAdpn en músculo esquelético indica que es este tejido, y no el hígado, el responsable en la mejora en la sensibilidad a insulina en condiciones de alimentación estándar. En el caso de la adiponectina globular, gAdpn , se ha descrito que ratones transgénicos que sobreexpresan gAdpn a nivel circulante presentan una mejora en la sensibilidad a insulina y también en la tolerancia a la glucosa (Yamauchi et al., 2003b). Este hecho indica posibles diferencias en los efectos de ambas formas de la adiponectina en cuanto a la tolerancia a la insulina y la glucosa en una situación no patológica y en condiciones estándar de alimentación.

No se observaron diferencias en cuanto a la captación basal de glucosa en músculo *in vivo* en los animales MLC/Adpn sanos. Se ha descrito que la fIAdpn incrementa la captación de glucosa en células musculares y hepatocitos *in vitro* (Yamauchi et al., 2002). Aunque también se ha postulado que únicamente la gAdpn podría mediar este efecto en músculo *in vitro* (Tomas et al., 2002). La diferencia en los resultados obtenidos puede ser debida a los posibles efectos diferentes de la gAdpn y la fIAdpn en el tejido muscular así como al origen recombinante de la fIAdpn utilizada. Probablemente, la gAdpn tenga una mayor capacidad de estimular la captación de

glucosa en músculo esquelético que la fAdpn . También, se ha de considerar que en el presente trabajo esta determinación se ha realizado *in vivo* mientras que en los trabajos previos esta determinación se realizó *in vitro* a concentraciones, aunque fisiológicas, altas de adiponectina.

Los ratones MLC/Adpn no presentan cambios en el peso corporal y la ingesta de alimento pero sí una tendencia a un mayor nivel de grasa corporal. Este incremento en la grasa corporal producido por la expresión de fAdpn en músculo esquelético acompañado de un incremento en la sensibilidad a insulina es similar a los efectos producidos por el tratamiento con TZDs (Combs et al., 2004). De hecho, ha sido descrito que el tratamiento con TZDs incrementa tanto en ratones como en humanos la síntesis de adiponectina, contribuyendo así, a la mejora en la sensibilidad a insulina inducida por estos fármacos (Maeda et al., 2001;Combs et al., 2002). De forma similar a lo que sucede en el modelo MLC/Adpn, ha sido descrito que ratones transgénicos macho que presentan niveles elevados de fAdpn circulante no presentan diferencias en el peso corporal ni cambios en la ingesta de alimento cuando son alimentados con dieta estándar pero sí las hembras, que muestran una tendencia a presentar un mayor peso y un mayor porcentaje de grasa corporal sin afectar la ingesta de alimento (Combs et al., 2004).

Se ha descrito que la adiponectina puede contribuir a una mayor captación de ácidos grasos por parte de los tejidos periféricos (Fruebis et al., 2001;Maeda et al., 2002). Los ratones MLC/Adpn no presentaron una mayor eliminación de ácidos grasos circulantes tras la administración de un bolo lipídico. Este resultado es acorde con resultados anteriores, en que animales transgénicos machos que

presentan niveles elevados de rAdpn circulante, no presentan una mejora en la captación de ácidos grasos libres ni de triglicéridos tras la administración de un bolo lipídico oral. En cambio, las hembras sí presentan una mejor eliminación de los ácidos grasos y de los triglicéridos de la circulación tras la administración del bolo (Combs et al., 2004). De la misma manera, la administración aguda de gAdpn aumenta la eliminación de ácidos grasos de la circulación tras la ingestión de un bolo de alimento alto en lípidos (Fruebis et al., 2001). Estos resultados sugieren que la gAdpn y no la rAdpn sería la responsable del aumento de la captación de ácidos grasos. Además, se deberían tener en cuenta el dimorfismo sexual existente en los efectos de esta hormona.

En el modelo MLC/Adpn, ambas líneas presentaron un mayor contenido de glucógeno mientras que no presentaban cambios en los niveles de lactato. Estas determinaciones se realizaron en animales alimentados sin estimular con insulina. Ha sido descrito *in vitro* que en presencia de insulina la adiponectina globular promueve la síntesis de lactato pero reduce la síntesis de glucógeno en células musculares (Ceddia et al., 2005).

Los animales transgénicos MLC/Adpn presentan una tendencia no significativa a presentar unos menores niveles de leptina circulante que contrastan con el incremento en los niveles de grasa corporal. En otro modelo transgénico, niveles elevados de rAdpn circulante no afectan a los niveles de leptina (Combs et al., 2004).

Estudios previos en cultivo han mostrado que cantidades de μ Adpn equimolares a γ Adpn e incluso superiores no incrementan la activación de AMPK y la oxidación de ácidos grasos en células musculares (Fruebis et al., 2001; Tomas et al., 2002). Sin embargo, se ha publicado que la μ Adpn también tiene actividad en músculo esquelético pudiendo activar AMPK aumentando la oxidación de ácidos grasos (Yamauchi et al., 2002). Los ratones MLC/Adpn presentan una mayor activación de AMPK indicando que la μ Adpn es capaz de activar en músculo esquelético AMPK. Además, la activación de AMPK va acompañada con una inhibición de la enzima ACC y aumento de la expresión de CPT-1 indicando un aumento del metabolismo de ácidos grasos. La activación de AMPK y la inactivación de ACC son mayores en los animales de la línea 17. Este dato sería acorde con la disminución en el contenido de triglicéridos en músculo observado en los animales de la línea 17 y con la mejora en la sensibilidad a insulina que presentaban estos animales alimentados con dieta estándar. Probablemente, la disminución en el contenido de ácidos grasos no se detecte en los animales de la línea 16 debido al menor grado de activación de AMPK e inactivación de ACC presentes en esta línea.

La activación del metabolismo de ácidos grasos en estos animales sugería que la expresión de adiponectina en el músculo esquelético podría proteger de la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en lípidos. Ha sido descrito que la administración sistémica tanto de μ Adpn como γ Adpn protege de la resistencia insulina en diferentes modelos de diabetes tipo 2 asociados a obesidad, incluido el modelo de inducción por dieta alta en lípidos (Yamauchi et al., 2001).

Con el objetivo de analizar si la actuación de la adiponectina exclusivamente en músculo también tenía un efecto protector frente a la resistencia a la insulina inducida por la dieta, animales MLC/Adpn jóvenes se alimentaron con dieta alta en lípidos durante un periodo de 4 meses. Los animales transgénicos MLC/Adpn mostraron una mayor facilidad para ganar peso en estas condiciones. Se ha descrito que la administración de μ Adpn en animales alimentados previamente con dieta alta en lípidos produce una reducción del peso corporal. En cambio, al administrar μ Adpn esta reducción de peso era inexistente o muy pequeña (Fruebis et al., 2001). En animales transgénicos que sobreexpresan μ Adpn a nivel circulante los animales machos no presentan una mejora en el peso corporal al ser alimentados con dieta alta en lípidos (Combs et al., 2004). Estos datos nos indicaban que el efecto de μ Adpn exclusivamente en músculo esquelético no sólo no evita la ganancia de peso corporal sino que la aumenta sin afectar a la ingesta de alimento. Además, los ratones MLC/Adpn mostraron una menor tolerancia a la insulina. Así pues, la acción de la adiponectina exclusivamente en músculo esquelético no es capaz de contrarrestar la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en lípidos.

Se analizó como afectaba la dieta alta en lípidos a los niveles de adiponectina circulante en este modelo. Aunque la obesidad está relacionada con niveles bajos de adiponectina circulante (Arita et al., 1999) los animales controles alimentados con dieta alta en lípidos mostraron un aumento de la adiponectina circulante tras 4 meses de alimentación con dieta alta en lípidos. Este hecho viene confirmado por estudios de expresión de microchips de DNA en los que paradójicamente se detecta un aumento de la expresión de adiponectina en el tejido adiposo de ratas

alimentadas con dieta alta en lípidos (Li et al., 2002; Lopez et al., 2004). Este aumento en la adiponectina circulante puede ser un mecanismo fisiológico compensatorio en un intento de mantener la sensibilidad a insulina en una situación de alimentación con dieta alta en lípidos. Durante el desarrollo de la obesidad este mecanismo se agota y conduce a los niveles bajos de adiponectina presentes en la obesidad. Los animales transgénicos MLC/Adpn no mostraron un aumento significativo en los niveles de adiponectina circulante en dieta alta en lípidos. De alguna manera, la expresión de μ Adpn en músculo esquelético evita el aumento de expresión de adiponectina en las fases iniciales de resistencia a la insulina inducida por dieta alta en lípidos. Este hecho está de acuerdo con la mayor ganancia de peso y la menor sensibilidad a la insulina detectada en los animales transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos.

Los animales MLC/Adpn mostraron niveles menores de leptina circulante respecto los controles tras la dieta alta en lípidos. La leptina también es una hormona secretada exclusivamente en el tejido adiposo cuyos efectos principales tienen lugar a nivel hipotalámico. Esta adipocina tiene un papel clave en la regulación de la ingesta de comida, gasto energético, peso corporal y control neuroendocrino (Friedman and Halaas, 1998). Además, estimula la oxidación de ácidos grasos (Muoio et al., 1997; Minokoshi et al., 2002) y la captación de glucosa (Kamohara et al., 1997; Haque et al., 1999) a la par que previene la acumulación de lípidos en tejido no adiposo que conducen a desajustes que reducirán la sensibilidad a la insulina (Unger, 2002). En el caso de los animales MLC/Adpn, presentaron niveles menores de leptina en dieta alta en lípidos sin afectar a la ingesta de alimento. Estos menores niveles de leptina en los transgénicos en dieta, junto con los

menores niveles de adiponectina, también pueden contribuir en la menor sensibilidad a insulina y el mayor incremento de peso observado en estos animales. Se han descrito interacciones entre estas dos hormonas. Por ejemplo, se sabe que la administración central de leptina disminuye los niveles de adiponectina y de insulina (Ueno et al., 2004). Además, la administración de leptina a nivel periférico incrementa los niveles de adiponectina en animales obesos (Delporte et al., 2004). Al igual que la leptina, se ha descrito que la administración central de adiponectina puede regular el peso corporal disminuyéndolo (Qi et al., 2004).

Para comprobar en otro modelo de expresión los efectos de μ Adpn exclusivamente en músculo esquelético, se expresó μ Adpn administrando vectores adenoasociados serotipo-1 (AAV-1) intramuscularmente en ratones controles alimentados con dieta alta en lípidos. Aunque existen antecedentes en la bibliografía en los que se utilizan vectores de transferencia virales para sobreexpresar adiponectina (Okamoto et al., 2002; Shklyayev et al., 2003; Satoh et al., 2005), tanto por el vector como por la vía de administración utilizada, en estos estudios previos la expresión de adiponectina se centraba en hígado y aumentaba los niveles circulantes de la hormona.

Al igual que se observó en los ratones MLC/Adpn, los animales que expresaban μ Adpn en músculo esquelético mediante transducción con virus AAV-1 no mostraron diferencias en el peso corporal al ser alimentados con una dieta estándar. En cambio, mostraron una mayor tendencia a ganar peso al ser alimentados con una dieta alta en lípidos. Estos resultados difieren de los efectos observados de la sobreexpresión de μ Adpn mediante AAV-5 en hígado de rata, en los que dicha expresión va acompañada de un aumento en los niveles circulantes de adiponectina

y sí protege de la ganancia de peso inducida por una dieta alta en lípidos (Shklyaeve et al., 2003).

De la misma manera que sucedía en los ratones MLC/Adpn, la expresión de μ Adpn no afecta a los valores de glucemia o de insulinemia de los animales alimentados con dieta alta en lípidos. Se detectó que en este caso la dieta alta en lípidos inducía un descenso en los niveles de adiponectina circulante en los animales controles a diferencia del aumento detectado en los animales controles de la dieta del modelo MLC/Adpn. Este hecho puede ser debido al diferente fondo genético de los animales utilizados, que en este caso, mostrarían en fases muy tempranas de la dieta el pico de expresión de adiponectina inducido por la dieta alta en lípidos descrito, para rápidamente, disminuir hasta los niveles bajos descritos en la obesidad. En cualquier caso, de la misma manera que sucedía en el modelo MLC/Adpn, los animales que expresaban adiponectina en el músculo esquelético mostraban en la dieta niveles inferiores de adiponectina que los controles.

Tampoco se observó una mejora en la sensibilidad a insulina inducida por la expresión de μ Adpn en este modelo de resistencia a insulina. Así pues, se corroboraba que la acción de la adiponectina exclusivamente en músculo esquelético no era capaz de contrarrestar la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en lípidos.

En esta primera parte de la tesis doctoral, se ha demostrado que la expresión de μ Adpn en músculo esquelético puede mejorar la sensibilidad a insulina en condiciones normales de alimentación. Además, es capaz de activar AMPK

aumentando así la oxidación de ácidos grasos y, que este hecho, podría ser en parte responsable de la mejora en la sensibilidad a insulina observada en dieta estándar. Por otra parte, se ha demostrado que los efectos de la adiponectina exclusivamente en músculo esquelético no son suficientes para proteger de la resistencia a insulina y la obesidad. Probablemente, sus efectos sobre el hígado son también importantes en el papel protector de la sensibilidad a la insulina y la obesidad propuesto para la adiponectina. Estos efectos en hígado de la adiponectina incluirían la activación de la AMPK y la fosforilación de ACC aumentándose la oxidación de ácidos grasos y una reducción en la gluconeogénesis mediada por una disminución en la expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y de glucosa-6- fosfatasa (G-6-Pasa) (Combs et al., 2002;Yamauchi et al., 2002).

La segunda parte del estudio se centró en analizar los efectos de la expresión de adiponectina en músculo en un modelo de resistencia primaria a la insulina. No existen antecedentes en la literatura sobre los efectos de la adiponectina en un modelo en que la resistencia a la insulina es debido a un defecto primario en la señalización de la propia insulina. Con este fin, se utilizaron animales genosuprimidos IRS-1^{-/-}. Los animales IRS-1^{-/-} presentan resistencia severa a insulina y alteración en la tolerancia a la glucosa. Estos animales son resistentes a insulina e hiperinsulinémicos pero, en cambio, no presentan obesidad. El interés de la utilización de este modelo radicaba, en primer lugar, en que se trata de un modelo de resistencia a la insulina que no presenta obesidad, a diferencia del modelo inducido con dieta alta en lípidos. En segundo lugar, este modelo no presenta resistencia a insulina en hígado, ya que IRS-2 compensa funcionalmente

en este tejido la falta de IRS-1 (Previs et al., 2000; Yamauchi et al., 1996). Además, la utilización de este modelo permitió estudiar si los efectos de la adiponectina como sensibilizador de la insulina tienen lugar independientemente de la presencia de IRS-1, el principal sustrato del receptor de la insulina en músculo esquelético.

En este caso, se utilizó la técnica de la electrotransferencia para conseguir la expresión de adiponectina en músculo esquelético. Dicha expresión de Adpn en músculo esquelético no afectó los niveles de glucemia en alimentación y ayuno en este modelo. Los resultados obtenidos en los tests de tolerancia a insulina y a glucosa demostraron que la expresión de adiponectina en músculo esquelético mejora la sensibilidad a insulina y la disponibilidad de glucosa de los animales IRS-1^{-/-}.

Los ratones genosuprimidos IRS-1^{-/-} mostraron *in vivo* una disminución en la captación basal de glucosa en músculo respecto a los ratones controles. En estudios previos no se describieron diferencias en la captación basal de glucosa en músculo esquelético de animales IRS-1^{-/-} (Gazdag et al., 1999; Yamauchi et al., 1996). En otro trabajo, se detectó un incremento en la captación basal de glucosa en el músculo de estos animales (Dumke et al., 2001). Uno de los factores que explican estas diferencias podría ser los diferentes métodos utilizados para determinar este parámetro. En los estudios anteriores, la determinación de la captación de glucosa se basaba en métodos *ex vivo* en los que se utilizaban 3-O-metilglucosa o 2-deoxiglucosa como trazadores. Además, al determinar la captación de glucosa mediante técnicas *ex vivo* no se tiene en cuenta la actuación de factores circulantes extramusculares que pueden intervenir en la regulación del

transporte de glucosa en músculo. El hecho de haber utilizado diferentes músculos en las determinaciones también puede afectar al resultado obtenido. En cuanto al tejido adiposo, los ratones IRS-1^{-/-} muestran *in vivo* un incremento en la captación basal de glucosa respecto los ratones controles. El incremento observado en la captación basal de glucosa en el tejido adiposo ha sido descrito con anterioridad en animales IRS-1^{-/-} (Tamemoto et al., 1994) y este hecho viene apoyado por la mayor importancia de IRS-2 en la captación de glucosa por parte de los adipocitos (Fasshauer et al., 2000). Al expresar μ Adpn en músculo esquelético, los ratones IRS-1^{-/-} incrementaron la captación de glucosa en los músculos estudiados. En paralelo, la restauración de la captación de glucosa en músculo esquelético mediada por la expresión de adiponectina lleva a una normalización de la captación de glucosa en el tejido adiposo de los animales IRS-1^{-/-}. Como consecuencia de la mejora en la sensibilidad a insulina y en el metabolismo de la glucosa en músculo esquelético de estos animales, se produce un descenso en los niveles circulantes de insulina, disminuyéndose así la hiperinsulinemia establecida. Estos hechos confirman que la resistencia en músculo esquelético de los animales IRS-1^{-/-} es la principal responsable de la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia detectadas en este modelo (Yamauchi et al., 1996). El aumento en la sensibilidad a insulina y la captación de glucosa en ratones IRS-1^{-/-} que expresan μ Adpn en músculo esquelético conduce a un aumento en el almacenamiento y la utilización de la glucosa en estos animales. Este hecho se manifiesta en un incremento en el contenido muscular de glucógeno y de glucosa-6-fosfato.

Aunque los mecanismos de actuación de la adiponectina no están claros, se ha descrito que la adiponectina incrementa la captación de glucosa y la sensibilidad a insulina interaccionando con la vía de señalización de la insulina, regulando el estado de fosforilación del receptor de la insulina (Stefan et al., 2002) o la propia actividad tirosina quinasa propia de este receptor (Yamauchi et al., 2001). También, se ha descrito que la adiponectina incrementa la actividad PI3-K asociada a IRS-1 (Maeda et al., 2002). En el presente trabajo, se demuestra que la adiponectina también incrementa la fosforilación de IRS-2 y su unión con p85, la subunidad reguladora de PI3-K, en animales controles estimulados con insulina. Los ratones IRS-1^{-/-} muestran una mayor fosforilación de IRS-2 y una mayor unión de p85 a este sustrato indicando un mecanismo compensatorio a través de IRS-2 debido a la ausencia de IRS-1^{-/-}. Esta compensación vía IRS-2 no compensa la resistencia a la insulina en músculo, aunque sí en otros tejidos como el hígado. La expresión de β Adpn en músculo esquelético de animales IRS-1^{-/-} estimulados con insulina conduce a una normalización en la fosforilación de IRS-2 en este modelo. Además, la disminución en la fosforilación de IRS-2 va acompañada de una disminución en su unión a p85 indicando una disminución en el mecanismo compensatorio presente en estos animales sin afectar a la fosforilación de Akt.

Otro de los mecanismos propuestos para explicar el aumento en la captación de glucosa en músculo esquelético mediado por adiponectina se basa en un aumento en la oxidación de ácidos grasos. Este efecto vendría mediado por la activación de AMPK y PPAR α (Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002; Yamauchi et al., 2003a). Además, se ha descrito que los mecanismos de captación de glucosa mediada por un aumento de la fosforilación de AMPK pueden tener lugar de una manera

dependiente de la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 (Russell, III et al., 1999; Kurth-Kraczek et al., 1999) o de una manera independiente de la translocación de este transportador (Abbud et al., 2000). En el presente trabajo se detectó un aumento en la activación de AMPK y en la expresión de PPAR α en músculo esquelético de ambos genotipos mediada por la expresión de adiponectina en este tejido. En ratones controles, la expresión de adiponectina también inducía el aumento de expresión de PPAR γ , CPT-1 y FATP-1. Estos cambios sugerían que la expresión de adiponectina inducía un incremento en la oxidación de ácidos grasos en los animales controles. Sin embargo, los efectos observados en la sensibilidad a insulina y la captación de glucosa en estos animales no son significativos. Los ratones IRS-1^{-/-} presentaron un incremento en la oxidación de ácidos grasos comparados con los animales controles tal y como sugieren la mayor activación de AMPK, la inactivación de la enzima ACC y la mayor expresión de CPT-1 y MCD. En cambio, los ratones genosuprimidos IRS-1^{-/-} mostraron una menor expresión de FATP-1. Probablemente, esta mayor predisposición a oxidar ácidos grasos en el músculo esquelético de los animales IRS-1^{-/-} tenga su origen en la menor disponibilidad de glucosa en este tejido presente en estos animales. Sin embargo, la expresión de adiponectina en los animales IRS-1^{-/-} incrementa la fosforilación de ACC disminuyendo su actividad y disminuye la expresión de PPAR γ y CPT-1 sugiriendo una normalización en la oxidación de lípidos en el músculo de estos animales. Esta diferencia en los efectos de la expresión de adiponectina observados en el metabolismo lipídico entre ambos genotipos es probablemente debido a la normalización en la sensibilidad a insulina y la disponibilidad de glucosa en el músculo de los ratones IRS-1^{-/-}. La normalización en el metabolismo de la glucosa

en los animales IRS-1^{-/-} lleva a una normalización del metabolismo lipídico siendo predominantes estos efectos a los descritos para la adiponectina en la oxidación de ácidos grasos.

En resumen, en la segunda parte de esta Tesis se demuestra que la expresión de adiponectina en el músculo esquelético incrementa la sensibilidad a insulina y la captación y utilización de glucosa en ratones IRS-1^{-/-}. Los efectos de la adiponectina en músculo estarían mediados por la interacción de la adiponectina con factores diferentes a IRS-1 o ubicados por debajo de este sustrato en la cascada de señalización de insulina y/o independientemente de esta vía de señalización. A diferencia de lo que sucede en el modelo de resistencia a insulina basado en la alimentación con dieta alta en lípidos, los animales IRS-1^{-/-} no presentan resistencia a insulina en hígado. En gran medida, la resistencia a la insulina en estos animales es debida a la resistencia presente en músculo esquelético (Yamauchi et al., 1996). De esta manera, la expresión de adiponectina en este tejido conseguía revertir la resistencia a insulina presente en el músculo contribuyendo a la normalización del metabolismo de estos animales. Además, este hecho evidencia que también es necesaria la normalización de la sensibilidad hepática a la insulina de cara a conseguir una mejora general del metabolismo de la glucosa en situaciones patológicas de resistencia a la insulina.

Es de gran interés el conocimiento de los mecanismos de actuación de la adiponectina y su potencial terapéutico. Este es un área de conocimiento que está en auge ya que permitirá entender mejor el desarrollo de la diabetes y la descripción de posibles dianas terapéuticas susceptibles de ser utilizadas en la terapia de la diabetes.

VI. CONCLUSIONES

Parte I

1. Se han obtenido ratones transgénicos que han incorporado en su genoma y expresan adiponectina localmente en músculo esquelético bajo el control del promotor de la cadena ligera de la miosina. Estos animales son viables y tienen una vida reproductiva normal.
2. La expresión de adiponectina exclusivamente en músculo esquelético de ratones transgénicos mejora la sensibilidad a insulina aunque no mejora la tolerancia ni la captación de glucosa en condiciones estándar de alimentación.
3. Dicha expresión activa AMPK, inactiva ACC y aumenta la expresión de CPT-1 poniendo de manifiesto una mayor predisposición a oxidar ácidos grasos en el músculo de estos animales.
4. La expresión de adiponectina en músculo esquelético en los animales transgénicos alimentados con una dieta alta en lípidos no mejora la sensibilidad a insulina y no protege de la obesidad probablemente debido a que no mejora la sensibilidad hepática a insulina.
5. En condiciones de alimentación con dieta alta en lípidos, la expresión de adiponectina en músculo esquelético afecta a la expresión en tejido adiposo de adipoquinas tales como la leptina o la propia adiponectina pudiendo influir en el balance energético general.

6. Se ha conseguido la expresión de adiponectina en músculo esquelético de ratones mediante la administración intramuscular de virus adenoasociados-1 (AAV-1).
7. La expresión de adiponectina en músculo esquelético de estos ratones alimentados con una dieta alta en lípidos no mejora la sensibilidad a insulina y no protege de la obesidad.
8. En resumen, ambas aproximaciones de expresión de adiponectina en músculo esquelético indican que dicha expresión no es suficiente para proteger de la resistencia a insulina y la obesidad inducida por una dieta alta en lípidos.

Parte II

1. Se ha conseguido la expresión de adiponectina en los músculos cuádriceps, gastrocnemio y tibialis de ratones IRS-1^{-/-} mediante electrotransferencia *in vivo* del gen de la adiponectina.
2. La expresión de adiponectina en el músculo esquelético de estos animales lleva a una mejora en la sensibilidad a insulina, a un incremento en la captación de glucosa y a una reducción de los niveles de insulina circulante.
3. La mejora en la sensibilidad a insulina y la captación de glucosa inducida por la expresión de adiponectina lleva a una normalización del metabolismo muscular de ácidos grasos en estos animales.

4. La acción de la adiponectina en músculo esquelético aumenta la fosforilación de IRS-2 en animales controles mientras que reduce la mayor fosforilación compensatoria de IRS-2 en animales IRS-1^{-/-}, indicando una normalización de la sensibilidad a insulina.

5. La utilización del modelo IRS-1^{-/-} ha permitido evidenciar que los efectos de la adiponectina tienen lugar por la interacción con factores diferentes a IRS-1 o ubicados por debajo de este sustrato en la cascada de señalización de insulina y/o independientemente de esta vía de señalización.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.1. Animales.

Los animales fundadores utilizados para establecer las dos colonias de transgénicos MLC/adiponectina para la primera parte de este trabajo eran ratones híbridos F2 B6 x SJL. Estos fundadores se cruzaron con animales controles C57Bl6. La descendencia de estos cruces se volvió a cruzar con animales controles C57Bl6. Los descendientes de este segundo cruce (N2) con animales C57Bl6 se utilizaron para este estudio. Eran animales hemicigotos para el transgén quimérico. Los animales utilizados para el experimento con AAV-1 eran animales controles de la cepa C57Bl6.

Los animales genosuprimidos para el gen del sustrato del receptor de la insulina- 1 (IRS-1^{-/-}) utilizados en la segunda parte del trabajo fueron cedidos por el Dr. Ronald Khan (Joslin Diabetes Center, and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA). Estos animales eran de la cepa 129;C57Bl6.

Todos ellos estaban alimentados *ad libitum*, es decir, sin restricción en el acceso a la comida, con una dieta estándar (Panlab, Barcelona, España) y se mantuvieron en condiciones de temperatura y luz controladas (ciclo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, con luces a partir de las 9:00 a.m.). Cuando se necesitó, los animales se ayunaron durante 16 horas. Las muestras se obtuvieron, a primera hora de la mañana (9:00-10:00 a.m.). Para la eutanasia de los animales, los ratones eran anestesiados con anestésicos inhalatorios (Fluothane[®]) y decapitados. Los tejidos y órganos eran diseccionados, congelados rápidamente en nitrógeno líquido, y mantenidos a -80°C hasta su procesamiento. En los experimentos se utilizaron ratones machos de entre 3 y 7 meses de edad. Los procedimientos experimentales se aprobaron por el Comité

de Ética y de Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.2. Obtención de los ratones transgénicos y establecimiento de las líneas.

Para la obtención de animales transgénicos se utilizó la técnica de microinyección de DNA en el pronúcleo masculino de oocitos fecundados (Nagy A., 2002). Los oocitos fecundados de ratón utilizados en la microinyección de DNA se obtuvieron a partir de hembras donantes híbridas B6SJLF1, procedentes del cruce de animales de las cepas genéticas C57BL/6J y SJL/J (Harlan). El gen quimérico MLC/Adpn se purificó por electroelución y se microinyectó en estos oocitos fecundados. Los oocitos microinyectados se implantaron en hembras receptoras de la cepa CD-1. Estos procesos se realizaron en el Servei de Biotecnologia Animal de la UAB.

Todos los animales nacidos tras la implantación de embriones se analizaron mediante Southern blot para la detección de los posibles animales transgénicos a partir del DNA extraído de la cola. Los ratones transgénicos detectados se usaron como fundadores de las líneas transgénicas. Con este fin, se cruzaron con animales controles C57Bl6 por dos generaciones. De esta manera se conseguían colonias transgénicas en hemicigosis. Se utilizaron hermanos de camada no transgénicos como controles de los animales transgénicos en los diferentes experimentos.

1.3. Cepas bacterianas y vectores plasmídicos.

La cepa bacteriana utilizada para la obtención de las diferentes construcciones plasmídicas fue la cepa DH5 α de *E. coli*. Los plásmidos utilizados incluían el gen de resistencia a ampicilina para su selección. Así, el crecimiento de estas bacterias se realizó a 37°C en medio de cultivo LB (*Miller's LB Broth*, Laboratorios CONDA,

Madrid) con una concentración de 50 mg/mL de ampicilina para su selección. Glicerizados de estas bacterias se conservaron a -80°C en medio LB con glicerol al 20% (vol/vol). Los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo fueron:

- pMLC/hINSmut1, que contenía el promotor del gen de la cadena ligera de la miosina (MLC1) junto con la secuencia de poliadenilización y el *enhancer* MLC1/3.

- pBluescript II KS+/ apM1, que contenía el cDNA completo de la adiponectina humana (gentileza del Dr. Norikazu Maeda, Department of Internal Medicine and Molecular Science (B5), Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan).

- pMLC/apM1, plásmido que contiene el gen quimérico obtenido a partir de los dos anteriores y utilizado para la generación del transgénico.

- pGEM- T Easy Vector/Acrp30, que se utilizó para clonar directamente el producto de amplificación del cDNA de la adiponectina murina (Acrp30) una vez obtenido.

- pTG6600, que contenía el promotor CMV y la secuencia de poliadenilización.

- pCMV/Adpn, plásmido utilizado para los experimentos de electrotransferencia en músculo obtenido a partir de los dos plásmidos anteriores y que contiene el cDNA de adiponectina murina y el promotor CMV.

- pCMV/ β gal, plásmido utilizado como control en los experimentos de electrotransferencia.

1.4. Sondas de DNA.

Para detectar la incorporación del transgén MLC/Adpn en las colonias de transgénicos se utilizó la sonda siguiente:

- sonda apM1: correspondiente al fragmento *EcoRI-EcoRI* de 0.8 Kb de la adiponectina humana (apM1).

En el caso del genotipado de la colonia de los animales genosuprimidos IRS-1^{-/-}, para detectar la presencia del vector de recombinación se utilizó la sonda siguiente:

- Sonda BH1: correspondiente al fragmento *BamHI-BamHI* de 2.5 Kb del vector de recombinación que se utilizó para la generación de estos animales.

Para los Northern blot se utilizaron las siguientes sondas:

- Sonda apM1: fragmento *EcoRI-EcoRI* de 0.8 Kb correspondiente al cDNA de la adiponectina humana.
- Sonda Acrp30: fragmento *EcoRI-EcoRI* de 0.8 Kb correspondiente al cDNA de la adiponectina murina.
- Sonda CPT-1: fragmento *EcoRI-EcoRI* de 2.6 Kb correspondiente al cDNA de rata.
- Sonda 18S: fragmento *EcoRI-EcoRI* de 5.7 kb del cDNA humano, cedida por el Dr. Gamboa.

1.5. Anticuerpos.

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

- anticuerpo específico contra la adiponectina humana (Chemicon).
- anticuerpo específico contra la adiponectina murina (Chemicon).
- anticuerpos policlonales contra la forma fosforilada y total de la AMPK- α (Cell Signaling Technology).
- anticuerpos policlonales contra la forma fosforilada y total de Akt (Cell Signaling Technology).
- anticuerpo policlonal contra la forma fosforilada de la ACC (Cell Signaling Technology).
- anticuerpo monoclonal contra fosfotirosina (Upstate).
- anticuerpo policlonal contra IRS-2 (Santa Cruz Biotechnology).
- anticuerpo policlonal contra p85 α (Santa Cruz Biotechnology).
- anticuerpo anti actina (Sigma).

2. MÉTODOS.

2.1. Obtención y análisis de DNA.

2.1.1. Preparación DNA plasmídico.

Para obtener pequeñas cantidades de DNA plasmídico (*"minipreps"*), éste se purificó a partir de unos 3-5 mL de medio de cultivo bacteriano, según el protocolo de lisis alcalina descrito originalmente por Birnboim y Doly (Birnboim and Doly, 1979). Gracias a este método rápido, se obtienen entre 3-4 μ g de plásmido por mL de medio de cultivo. Este protocolo consiste en la degradación de la pared bacteriana por la acción

de la lisozima (solución de lisozima: Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM, Lisozima 5 mg/mL). Tras la acción de la lisozima, se realiza una lisis alcalina del esferoplasto (solución de lisis: NaOH 0.2 M, SDS 1%) y una precipitación selectiva del DNA genómico bacteriano y de las proteínas desnaturalizadas mediante una solución concentrada de acetato potásico a pH ácido (Acetato potásico 3 M pH 4.8, ácido acético glacial 2 M). El DNA plasmídico (sobrenadante resultante) se purifica mediante la precipitación con isopropanol y el lavado con etanol al 75%. Oportativamente, para degradar el RNA bacteriano, se añadió RNAsa A a la solución de lisozima (concentración final 100 µg/mL de RNAsa A).

Sin embargo, para la obtención de mayores cantidades de DNA, se realizaron purificaciones a partir de 250-500 mL de medio de cultivo. Aunque se utiliza el mismo principio de obtención (lisis alcalina), la purificación del DNA se realiza mediante columnas comerciales QIAGEN *Plasmid Maxi kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). El DNA plasmídico libre de endotoxinas se obtuvo a partir 1000-1500 mL de medio de cultivo y se purificó por el método de la lisis alcalina siguiendo el protocolo de *EndoFree Plasmid Mega kit* de la casa QIAGEN (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). Este protocolo está diseñado para la obtención de hasta 2.5 mg de DNA plasmídico libre de endotoxinas. El DNA plasmídico así obtenido se utilizó para la electrotransferencia “*in vivo*”.

2.1.2. Digestión enzimática del DNA.

Las endonucleasas de restricción son enzimas purificadas de bacterias o de hongos, que presentan una elevada especificidad frente a secuencias cortas de DNA y actúan sobre ellas rompiendo los enlaces fosfodiésteres y por tanto, la cadena de DNA. Estas enzimas son comerciales y vienen resuspendidas en soluciones que contienen un 50% de glicerol. Su actividad enzimática puede ser afectada por diferentes factores,

como la composición del tampón de restricción, especialmente pH y concentración de iones, la temperatura de incubación o si el DNA está metilado o no. De forma general, el DNA se digiere en una proporción de 1 unidad de enzima por microgramo de DNA, evitando superar el 5% de glicerol en el tampón de restricción. El tiempo de digestión es variable según el tipo de DNA de que se trate, oscilando entre 1-2 horas para el DNA plasmídico y toda una noche para el DNA genómico. Los productos de restricción son analizados en geles de TAE/agarosa.

2.1.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.

2.1.3.1. Geles de agarosa.

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

2.1.3.2. Purificación de los fragmentos de DNA.

Para la purificación de los fragmentos de DNA de los geles de agarosa se utilizó el producto comercial *QIAEX II[®] Gel Extraction kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) siguiendo el protocolo comercial. Éste es un método rápido basado en la disolución

del fragmento de agarosa, que contiene la banda deseada, en un agente caotrópico. En este caso, el agente caotrópico utilizado era una solución saturada de NaI. Estas condiciones permiten una adsorción selectiva del DNA a una matriz de sílice. Posteriormente, el DNA se lava y se eluye en condiciones de baja fuerza iónica, que favorecen la separación del DNA de la matriz de sílice.

2.1.3.3. Defosforilación de vectores.

La defosforilación se realiza para evitar que el vector linearizado pueda recircularizar cuando se digiere el vector con un único enzima de restricción. Para ello se utilizó 1 unidad de fosfatasa por μg de DNA (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Promega) en el tampón comercial 1X. La reacción de defosforilación se realizó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se inactivó la fosfatasa a 65 °C durante 15 minutos para evitar cualquier interacción de la fosfatasa en la reacción de ligación.

2.1.4. Construcción de moléculas híbridas de DNA.

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

2.1.4.1. Subclonaje de los fragmentos de DNA.

Las técnicas de subclonaje son ampliamente utilizadas con diferentes finalidades. Consisten en la digestión del DNA mediante las enzimas de restricción y la ligación de los fragmentos deseados con vectores plasmídicos, digeridos también con enzimas de restricción. Estas técnicas han sido utilizadas en la obtención del gen quimérico MLC/apM1 así como para la obtención del vector electrotransferido pCMV/Adpn.

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

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

2.1.5. Clonación de *Acrp30*.

A partir de RNA total de tejido adiposo extraído mediante QIAzol[®] Lysis Reagent (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) de animales controles se realizó una reacción de

RT-PCR específica para obtener el cDNA de Acrp30 (*SuperscriptTM II RNase H Reverse Transcriptase*, Cat.No. 18064-022, GibcoBRL, Life Technologies). Con este fin, el cebador (*primer*) utilizado en la reacción reconocía una región 3' *downstream* de la secuencia TGA STOP. En el cebador se incluyó una secuencia diana para *EcoRI* que facilitó la clonación posterior. Una vez obtenida la primera hebra de DNA se realizó una PCR de amplificación de esta utilizando un método con baja tasa de error para evitar la introducción de mutaciones puntuales en el cDNA de Acrp30 (*ExpandTM High Fidelity PCR System*, Cat. No. 1732641, Boehringer Mannheim). En este caso se utilizaron dos cebadores, uno que reconocía una región 5' *upstream* de la secuencia ATG de inicio de la traducción y otro que una región 3' *downstream* de la secuencia TGA STOP utilizado en la RT-PCR. Ambos cebadores incluían secuencias diana para *EcoRI*. De esta manera se obtuvo un fragmento de 0.8 Kb de DNA *EcoRI-EcoRI* de doble hebra que contenía el cDNA completo de adiponectina murina. La secuencia del cDNA se comprobó mediante secuenciación. La secuencia amplificada contenía una mutación puntual respecto a la primera secuencia de referencia publicada. Esta mutación consistía en la sustitución del residuo Metionina 113 por un residuo Valina en esta posición. El alineamiento de secuencias de la adiponectina murina y humana demuestran la presencia de un residuo Valina en la posición respectiva del ortólogo humano (Arita et al., 1999). Por tanto, esta mutación puede ser considerada irrelevante en cuanto a su función. Además, esta secuencia ha sido ya descrita y su funcionalidad comprobada con éxito (Shklyayev et al., 2003). El cDNA de Acrp30 se clonó en el lugar *EcoRI* del plásmido pTG6000 que tenía el promotor CMV. Se chequeó la direccionalidad correcta de la inserción con los enzimas *Bgl I* y *Bgl II*, ambos presentes en el cDNA y en el plásmido, y *EcoRI*, *NheI* y *HindIII*. Este nuevo plásmido se denominó pCMV/Acrp30 y se utilizó para expresar adiponectina mediante electrotransferencia en músculo esquelético.

2.1.6. Marcaje radiactivo de las sondas de DNA.

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

2.2. Detección de los animales transgénicos.

2.2.1. Obtención de DNA genómico.

Para la obtención de DNA genómico se siguió una adaptación del método de De Wet (de Wet et al., 1987). Para ello, biopsias de cola de 0.5 cm de animales de tres semanas de edad se homogenizaron en una solución de lisis tamponada (SDS 0.2%, proteinasa K 10 mg/mL 1%, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM pH 8, Tris-HCl 100 mM pH 8.5) y se incubaron a 56°C toda la noche. Esta incubación permite la digestión del tejido por la proteinasa K, liberando el DNA genómico de las células. Tras la digestión, se añadieron 250 μ L de una solución saturada de NaCl, se centrifugó durante 15 minutos a 12000xg y se recuperó el sobrenadante. A partir de este sobrenadante se precipitó el DNA genómico con isopropanol y se centrifugó durante 15 minutos a 12000xg. En este punto, el DNA aparece en forma de un precipitado blanquecino o *pellet* en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante mediante aspiración.

Posteriormente, se lavó el *pellet* de DNA con etanol al 75%, se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 16000xg y se descartó nuevamente el sobrenadante por aspiración. Tras dejar evaporar los restos de etanol 5 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió el DNA en 55 μ L de agua o de TE, previamente calentada a 56°C para favorecer la resuspensión. Finalmente, el DNA así obtenido se analizó mediante Southern blot.

2.2.2. Análisis de DNA mediante Southern blot.

2.2.2.1. Digestión y electroforesis de DNA genómico.

El genotipado, tanto de las colonias de animales transgénicos MLC/Adpn como de la colonia de animales genosuprimidos IRS-1^{-/-} se realizó mediante Southern blot. Para ambas genotipaciones se realizó una digestión enzimática a 37°C durante toda la noche de 10 μ g de DNA genómico, con la enzima de restricción *Bgl II* en el caso de la colonia de animales transgénicos y con *BamHI* en el caso de la colonia de animales genosuprimidos IRS-1^{-/-}. Tras la digestión, se añadió tampón de carga 10x (Glicerol 50%, EDTA 100 mM, SDS 1% y azul de bromofenol 0.1%) al DNA genómico digerido y se sometió a electroforesis en gel de TAE con un 1% de agarosa y 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio. En las electroforesis de DNA se utilizó un marcador de peso molecular (*DNA Molecular Weight Marker X*, Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Tras la electroforesis (4-5 horas a 45-65 voltios), el gel de agarosa se trató con HCl 0.25 M durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. El tratamiento ácido se utilizó para despurinizar el DNA y asegurar que los fragmentos de elevado peso molecular sean transferidos correctamente desde el gel a la membrana. Tras el tratamiento ácido, el gel se trató con solución alcalina (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M)

durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente, para desnaturalizar la doble cadena de DNA. Finalmente, el gel se trató con una solución neutralizante (Tris 1 M, NaCl 3 M) durante 30 min en agitación a temperatura ambiente, para neutralizar el pH del gel y volver a cargar negativamente el DNA.

2.2.2.2. Transferencia de DNA a membrana.

Tras el tratamiento del gel de agarosa, se realizó la transferencia del DNA desde el gel a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). El método de transferencia utilizado fue el sistema Turboblotter[®] (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). Este sistema consiste en la capilaridad en tampón de alta fuerza iónica SSC 10x (NaCl 1.5M, citrato sódico 0.15 M pH 7.4) a través de papeles absorbentes GB002 y GB004 (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). Transcurrido un mínimo de dos horas de transferencia, el DNA se fijó a la membrana de nylon mediante la irradiación de 120000 μ J de luz ultravioleta en 25-50 segundos, con el sistema UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA) con el fin de crear uniones covalentes entre el DNA y la membrana.

2.2.2.3. Hibridación de la membrana.

Una vez el DNA se fijó a la membrana de nylon, la membrana se prehibridó con la solución de prehibridación/hibridación (Na₂HPO₄ 0.25 mM pH 7.2, SDS 20%, EDTA 1mM, Blocking reagent 0.5%) durante un mínimo de dos horas a 65°C en agitación rotacional. Esta solución bloquea la membrana que no contiene DNA fijado, gracias al detergente SDS, los fosfatos y el *blocking reagent* (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Bloqueando la membrana, se reduce la hibridación inespecífica cuando se hibrida con sondas marcadas radiactivamente. Tras la prehibridación, las

membranas se hibridaron con la sonda marcada radiactivamente correspondiente al Southern blot a realizar, en agitación rotacional a 65°C durante toda la noche.

2.2.2.4. Lavados de la membrana y revelado.

Tras la hibridación, las membranas se lavaron con soluciones astringentes para eliminar el exceso de sonda y la radiactividad inespecífica que pudiera unirse a la membrana mediante uniones débiles. Con este fin se realizaron tres lavados consecutivos con dos soluciones de diferente astringencia. Los dos primeros lavados se realizaron con solución de baja astringencia (NaCl 300 mM, citrato sódico 30 mM, SDS 0.1%) durante 15 minutos a 30°C en agitación rotacional. El último lavado se realizó con solución de alta astringencia (NaCl 15 mM, citrato sódico 1.5 mM, SDS 0.1%) durante 10 minutos a 65°C en agitación rotacional. Si los lavados han sido efectivos, tan sólo la sonda radiactiva que se haya unido a su fragmento de DNA complementario permanecerá en la membrana, reduciendo así la radiactividad inespecífica (*background*). Finalmente, las membranas se expusieron en una película fotográfica o en una pantalla radiosensible para obtener la señal que permitiera la genotipación de los animales.

2.2.3. Análisis de DNA mediante PCR.

El genotipado de la colonia MLC/Adpn también se realizó mediante técnicas de PCR. Para esta técnica se utilizaron dos primers *sense* y uno *antisense*. El primero de los primers *sense* utilizados servía para detectar la presencia promotor del gen quimérico. Este primer presenta homología con el promotor MLC en la secuencia que comienza -150 pb *upstream* de la secuencia de inicio de la transcripción del cDNA de la adiponectina humana: primer fw MLC 5' ATg CTg TTg CTg ggA gCT gTT 3'. Para comprobar que la secuencia de inicio de la transcripción se encontraba intacta se utilizó otro primer *sense* que solapaba con la ATG: primer fw int 5' ATg CTg TTg CTg

ggA gCT gTT 3'. En los dos casos el primer *antisense* utilizado comienza su homología en el nucleótido +233 del ORF de la adiponectina humana: primer rv int: 5' TCC CTT Agg ACC AAT AAg ACC 3' . Las condiciones de amplificación para ambas reacciones fueron idénticas: Un ciclo de 2' a 95 °C, 30 ciclos de 1' a 94°C como temperatura de *melting*, 1' a 58°C como temperatura de *annealing* y 74°C como temperatura de elongación. La reacción finalizaba con un ciclo de 5' a 72°C. Todos los reactivos utilizados se encontraban alicuotados en diferentes soluciones estock. El volumen final de reacción era de 50 µl de los cuales:

<u>Reactivo</u>	<u>[STOCK]</u>	<u>Volumen por reacción</u>	<u>[reacción]</u>
Buffer Mg ⁺⁺ free	10X	5µl	1x
Primer 1	100 pmol/µl	0.25µl	0.5 pmol/µl
Primer 2	100 pmol/µl	0.25µl	0.5 pmol/µl
dNTP	25 mM	0.4µl	20 µM
MgCl ₂	25 mM	5µl	2.5 mM
Taq	5U/µl	0.4µl	2U
H ₂ O		36.7µl	

Todos estos reactivos se mezclaron preparando una master mix teniendo en cuenta el número de muestras a analizar. Se añadía un volumen de 48µl de la master mix a cada tubo con 2 µl de DNA diluido a 100 ng/µl para una cantidad total de 200 ng de DNA en la reacción.

2.3. Preparación y análisis de RNA.

2.3.1. Extracción de RNA total.

La obtención de RNA total se realizó mediante el uso de la solución TriPure[®] Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) siguiendo el protocolo

comercial a partir de músculo congelado en nitrógeno líquido. En el caso de la extracción de RNA total de tejido adiposo para la clonación de Acrp30 se utilizó QIAzol[®] Lysis Reagent (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). Estos métodos se basan en la separación del RNA mediante fenol-cloroformo y la protección del RNA gracias a la solución de guanidina tiocianato, que actúa como inhibidor de ribonucleasas. Este método fue descrito por Chomczynski and Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Tras la precipitación del RNA con isopropanol y los posteriores lavados con etanol al 75%, el RNA se resuspendió en agua con dietilpirocarbonato (DEPC), que actúa como inhibidor de ribonucleasas, calentada a 56°C. El RNA se resuspendió en un volumen de entre 50-80 µl dependiendo del rendimiento de la extracción. Finalmente, se determinó la concentración de RNA de las diferentes muestras midiendo absorbancia a 265nm.

2.3.2. Electroforesis de RNA.

A partir de RNA total extraído de los diferentes tejidos, se realizó la electroforesis en geles de MOPS/agarosa al 1% (MOPS/EDTA 10x, H₂O estéril, agarosa) con 2.2 M de formaldehído. Antes de la carga de las muestras de RNA en el gel de agarosa, se añadió a la cantidad de RNA, un tampón de carga desnaturizante 5x (formamida desionizada, MOPS/EDTA 10x, formaldehído, H₂O estéril, glicerol y azul de bromofenol y xilencianol como colorantes). Posteriormente, las muestras de RNA se calentaron a 65°C durante 15 minutos, tras los cuales se cargaron inmediatamente en el gel de agarosa. Este tratamiento térmico permite la desnaturalización de la estructura secundaria del RNA, y la presencia del formaldehído, tanto en el gel como en el tampón de carga, evita su renaturalización. Como tampón de electroforesis se

utilizó una solución de MOPS/EDTA 1x (MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 1 mM pH 7). Gracias a todas estas condiciones de electroforesis, el RNA permanece desnaturalizado, permitiendo la separación de los diferentes RNA según su peso molecular. Además, para evitar la degradación enzimática del RNA por ribonucleasas, todas las soluciones utilizadas, tanto para la formación del gel como el tampón de carga y el de electroforesis, se prepararon en condiciones libres de contaminación y se autoclavaron, excepto la solución de MOPS/EDTA 10x que se filtró.

2.3.3. Análisis de RNA mediante Northern blot.

Una vez se cargó el gel de agarosa con las muestras de RNA desnaturalizadas, se dejó correr la electroforesis 4-5 horas entre 30-50 voltios. A continuación se transfirió a una membrana de nylon con el sistema Turboblotter[®], de la misma manera que en el Southern blot, excepto que en este caso no se trataron con las soluciones ácida, alcalina y neutralizante. Tras la transferencia, el RNA se fijó a la membrana de nylon mediante luz ultravioleta. Para visualizar el estado de los RNAs y descartar las membranas con RNAs degradados, las membranas se teñían con una solución colorante de azul de metileno. Para esta tinción, la membrana se trató previamente con ácido acético al 5% (2-5 minutos) y posteriormente se tiñó con una solución de azul de metileno (acetato sódico 150 mM, azul de metileno 0.02%, H₂O). Tras la tinción, las membranas se lavaron con agua destilada hasta visualizar las bandas 28S y 18S del RNA ribosómico. Las membranas se prehibridaron, hibridaron, lavaron y expusieron en una película fotográfica o en una placa radiosensible de igual forma que en el Southern blot. Las bandas se cuantificaron mediante densitometría de los diferentes mRNAs y valor obtenido normalizado por la densitometría de la carga de RNA (18S).

2.4. Preparación y análisis de proteínas.

2.4.1. Extracción de proteínas totales.

Las proteínas totales se obtuvieron mediante la homogenización de los fragmentos de tejidos congelados, de unos 100 mg, en 1 mL de tampón de homogenización, utilizando un homogenizador de tipo Polytron[®]. La composición del tampón de homogenización fue la siguiente: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Sacarosa 240 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, β -glicerofosfato sódico 10 mM, Tampón fosfato 5 mM, Tritón X-100 al 1%. Una vez preparado se filtró con un filtro de 0.22 μ m y se conservó a 4°C. Para la preparación del tampón fosfato (0.5 M pH 7): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 0.5 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 M. Se añadió el $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ sobre el $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ hasta conseguir el pH 7. Este tampón también se filtró con un filtro de 0.22 μ m y se conservó a 4°C. Inmediatamente antes de usar el tampón de homogenización, se añadieron los inhibidores de proteasas (una pastilla de la mezcla de inhibidores por cada 10 mL de tampón de homogenización, *Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* de Roche Diagnostics GMBH, Germany) y fosfatasas (Na_3VO_4 1 mM). Una vez añadidos los inhibidores de proteasas y fosfatasas, el tampón de homogenización se mantuvo siempre en hielo, al igual que el extracto resultante en los sucesivos pasos. Tras homogenizar los tejidos, el extracto se mantuvo en agitación a 4°C durante 1-2 horas y posteriormente se centrifugó a 16000xg durante 20 minutos a 4°C. A partir del sobrenadante, se determinó la concentración de proteínas de los extractos mediante el método Bradford y se realizaron diferentes alícuotas que se guardaron congeladas (-80°C) hasta su utilización.

2.4.2. Inmunoprecipitación.

Para estudiar los tejidos estimulados con insulina los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de solución anestésica. Para la preparación de 10 mL de la solución anestésica, se mezclaron 0.5 mL de Rompun[®] (hidroclorato de xilacina al 2%, Bayer, Leverkusen, Germany) con una solución de 2 mL de Imalgene[®] (hidroclorato de ketamina al 0.5%, Merial, Lyon, France) y 7.5 mL de PBS. Esta solución anestésica se preparó inmediatamente antes de su uso. Para anestesiarse a los animales, se inyectaron intraperitonealmente 10 μ L de solución anestésica por gramo de peso. Una vez anestesiados se procedió a extraer los músculos tibialis y gastrocnemio de una de las extremidades posteriores. En este momento se administraron intraperitonealmente 5 U de insulina. A los 10 minutos de la estimulación con insulina se extrajeron los músculos de la otra extremidad posterior y el animal fue eutanasiado. De esta manera se contaba con tejido estimulado con insulina y su control basal. Se extrajo la proteína tal y como se ha descrito previamente. Los extractos musculares se incubaron con un anticuerpo contra IRS-2. Los inmunocomplejos formados se recuperaron mediante proteína A inmovilizada en microbolas de agarosa (Sigma). Tras ser lavados con tampón de homogenización, los inmunocomplejos se solubilizaron en tampón de Laemmli y se resolvieron en gel de poliacrilamida tal y como se explica más adelante.

2.4.3. Determinación de la concentración de proteínas.

Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford, basado en el cambio de color del colorante azul brillante de coomassie cuando forma complejos con las proteínas. Este cambio de color produce un cambio en el máximo de absorción de este cromóforo (de 465 nm a 595 nm). A partir de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) a 1 mg/mL se realizó una recta patrón entre 0 y 20 μ g de BSA. El volumen de la reacción era de 1 mL, de los cuales 800 μ L

eran agua con los estándares de la recta patrón, y 200 μ L del reactivo de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad, Manchen, Germany). La misma reacción se realizó con las muestras de los diferentes extractos. En el caso de extractos musculares se realizó una dilución de 1:50, mientras que no era necesario diluir los extractos del tejido adiposo. Tras añadir el reactivo de Bradford, las muestras se agitaron y se incubaron durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteína de los diferentes extractos se obtuvo a partir de la interpolación de sus absorbancias en la recta patrón calculada.

2.4.4. Análisis de las proteínas mediante Western blot.

2.4.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El análisis de las proteínas se realizó mediante la electroforesis de las muestras proteicas en geles de poliacrilamida al 10%, en presencia de SDS (Laemmli, 1970). El gel de poliacrilamida SDS-PAGE se formó por la fusión de dos geles. El primero de ellos es el gel compilador o *stacking*, el cual contenía un 3.9% de poliacrilamida y que forma los pocillos donde se depositan las muestras. El segundo, se trata gel separador o *resolving*, el cual contenía un 10% de poliacrilamida y en el cual se separan las proteínas. Las muestras proteicas (-80°C) se descongelaron en hielo. La cantidad de proteínas a cargar se mezcló con $\frac{1}{2}$ volumen de tampón de carga Laemmli 2x (Tampón fosfato 20 mM. Glicerol 20%, SDS 4%, 2- β -mercaptoetanol 2% y azul de bromofenol como colorante). Tras desnaturalizar las proteínas a 95°C durante 5 minutos, las muestras se cargaron inmediatamente al gel SDS-PAGE. Como tampón para la electroforesis se utilizó el siguiente: Tris base 5 mM, Glicina 192 mM,

SDS 0.1% (peso/vol). La electroforesis se realizó a 45 mA mientras las muestras atravesaban el gel compilador, cambiando a 60 mA cuando atravesaban el gel separador. En la electroforesis se utilizaron marcadores de pesos moleculares para proteínas preteñidos (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

2.4.4.2. Transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección.

La electrotransferencia de las proteínas desde el gel a las membranas *Immobilon-P* (Millipore, Billerica, MA, USA) se realizó con un aparato *Transblot modelo 2051* de LKB/Pharmacia a 250 mA durante dos horas en tampón de electrotransferencia (Tris 25 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%). Tras la transferencia, las membranas se bloquearon con TBS-T (Tris-HCl 25 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0.05%) con leche desnatada en polvo al 5% durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Las membranas se lavaron en TBS-T (3 lavados de 5-10 minutos) y se incubaron una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios, biotinilados o conjugados con la enzima peroxidasa, diluidos 1:2000 en solución de bloqueo. En el caso del anticuerpo secundario biotinilado, las membranas se trataron con el producto comercial *ImmunoPure® ABC Peroxidase Staining kit Standard* (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, USA). Finalmente las membranas se lavaron con TBS-T (3x5-10 minutos). La inmunodetección se realizó mediante el producto comercial *ECL® Western Blotting analysis system* (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany) siguiendo el protocolo del fabricante. La membrana tratada con el *ECL®* se expuso en un film fotográfico para la visualización de la señal.

2.5. Dieta alta en lípidos.

Para los experimentos de dieta alta en lípidos, se administró una dieta alta en lípidos (HFD) (TEKLAD, TD 88137, Madison, Wisconsin, USA) *ad libitum* durante el tiempo descrito a ratones machos controles y transgénicos MLC/Adpn de tres meses de edad. A otro grupo de animales controles y transgénicos MLC/Adpn se les siguió administrando la misma dieta estándar utilizada para el mantenimiento de los animales (Panlab, Barcelona, España). En el caso de los ratones tratados con AAV1 también se trataba de machos controles de 3 meses de edad pero se utilizó otra dieta estándar, muy similar a la anterior (Harlan, 2018S). Dado su alto contenido lipídico, la dieta HFD es muy sensible a la oxidación y se almacena a 4°C fuera del alcance de la luz. Para evitar que la dieta HFD se oxidara, disminuyendo su palatabilidad, la dieta HFD se renovó semanalmente aunque quedara parte de ella.

2.6. Determinación de la ingesta.

La ingesta de alimento, tanto de dieta estándar como de dieta alta en lípidos (HFD), se determinó en animales hermanos de camada separados en diferentes jaulas según su genotipo. La cantidad de comida ingerida por animal se obtuvo de la diferencia entre la cantidad inicialmente adicionada y la cantidad remanente trascurrida una semana dividido entre la cantidad de ratones por jaula. Se consideraron los valores de varias semanas. El resultado se expresó como la ingesta de alimentos en gramos por día y animal.

2.7. Test de tolerancia la glucosa.

Esta prueba se utiliza para determinar si el individuo es capaz de responder correctamente a una sobrecarga de glucosa, valorando el nivel de tolerancia a la glucosa. Se determinó la glucemia basal en ratones despiertos y ayunados durante una noche (aprox. 16 horas) a partir de una gota de la vena de la cola mediante el

sistema Glucometer Elite[®]. Tras la inyección intraperitoneal de una dosis de 2 g de glucosa por kg de peso vivo, se determinó la evolución de la glucemia a lo largo del tiempo. Durante este proceso los animales estaban sin acceso a comida ni a agua. Los resultados se expresaron como las glucemias en mg/dL en los diferentes puntos del experimento.

2.8. Test de tolerancia a la insulina.

Esta prueba permite valorar la sensibilidad a la insulina de un individuo, considerándose resistentes a la insulina aquellos que muestran una reducida respuesta hipoglucemiante a la hormona. Tras retirar la comida y la bebida a los animales, se determinó inmediatamente la glucemia basal en ratones despiertos a partir de una gota de la vena de la cola, mediante el sistema Glucometer Elite[®]. Posteriormente, se inyectó intraperitonealmente una dosis de 0.75 U de insulina (Humulina Regular[®]; Eli Lilly, Indianapolis, IN) por Kg de peso vivo y se determinó la evolución de la glucemia a lo largo del tiempo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de los niveles circulantes de glucosa en los diferentes puntos del experimento, respecto a los niveles basales previos a la inyección de la hormona.

2.9. Test de tolerancia a ácidos grasos.

A animales ayunados y anestesiados con la solución anestésica de ketamina/ xilacina se les administraron vía yugular 30µl de Intralipid[®] 20%. Se extrajo sangre por la vena caudal a los tiempos indicados y se determinó la concentración de ácidos grasos. Los valores obtenidos a lo largo del test se representan como porcentaje respecto los valores obtenidos en el minuto 3 tras la inyección.

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

Para la determinación del metabolismo de la glucosa *in vivo* en los tejidos, se utilizó un método derivado de la técnica de Sokoloff (Sokoloff et al., 1977). Este método se basa en las propiedades bioquímicas del análogo no metabolizable de la glucosa, 2-deoxi-*D*-[1-³H]-glucosa (2-DG; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) (Ferre et al., 1985). Una vez la 2-DG circulante es captada por los tejidos a través de los mismos transportadores que la glucosa, es fosforilada por las hexoquinasas presentes en el tejido, iniciándose así su entrada en las vías metabólicas. Pero la forma fosforilada de la 2-DG, la 2-DG-6-fosfato, no puede proseguir su metabolización y se acumula en los tejidos. Así, la determinación intratisular de 2-DG-6-fosfato es un parámetro que nos ayuda a valorar la capacidad de captación y utilización de la glucosa por los tejidos, siempre que su degradación por la glucosa-6-fosfatasa (G-6Pasa) sea despreciable. La actividad G-6Pasa es alta en los tejidos gluconeogénicos (hígado y riñón) pero muy baja en el resto de tejidos (Lackner et al., 1984). Para la determinación del índice de utilización basal de la glucosa *in vivo* en el músculo esquelético y tejido adiposo blanco (WAT) y marrón (BAT), se inyectó a través de la yugular 1 μCi de 2-DG marcada con tritio a animales machos alimentados de los diferentes grupos experimentales. La eliminación específica de 2-DG de la circulación se determinó según el método de Somogyi (Somogyi M., 1945), a partir de 25 μL de sangre extraída de la cola a los tiempos 1, 15 y 30 minutos después de la inyección. Transcurridos 30 minutos, los animales se sacrificaron, y el BAT, WAT epididimal y los músculos esqueléticos gastrocnemio y cuádriceps se extrajeron rápidamente. El índice de utilización de la glucosa se determinó como la medida de la acumulación de compuestos radiomarcados en el músculo esquelético, WAT y BAT (Ferre et al.,

1985). La cantidad de 2-DG-6-fosfato por miligramo de proteína de tejido se dividió por la disponibilidad de 2-DG circulante para los tejidos, calculada como la integral de la relación entre la concentración de 2-DG y la glucosa no marcada en la sangre. Como los valores no estaban corregidos por la “constante de discriminación” de la 2-DG en las vías metabólicas de la glucosa, los resultados se expresaron como el índice de utilización de la glucosa, en picomoles por miligramo de proteínas por minuto. Los valores también se expresaron como porcentaje respecto al control o unidades arbitrarias.

2.11. Determinación del contenido de grasa corporal.

Para determinar el contenido de grasa corporal se utilizó la carcasa de los ratones siguiendo el método de Salmon and Flatt (Salmon and Flatt, 1985). Para la obtención de la carcasa los ratones se pesaron, se sacrificaron, y se separaron los intestinos y el estómago, pesando finalmente la carcasa. Las carcasas de los animales se digirieron en 50 mL de solución de KOH etanólica al 10% durante 48 horas a 60°C. Tras la digestión, las muestras se pesaron y se tomaron alícuotas de 500 μ L de la digestión. A estas alícuotas se les añadió 50 μ L de $MgCl_2$ 5 M y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 16000xg durante 10 minutos. A partir del sobrenadante resultante se determinó la concentración de triglicéridos. Tras determinar la cantidad de grasa corporal total de cada animal, en gramos de triglicéridos, se representó en porcentaje de grasa corporal respecto el peso total de la carcasa previo a la digestión. En algunos casos el contenido de grasa corporal se calculó como el porcentaje del peso del tejido adiposo perigonadal respecto el peso corporal.

2.12. Determinación glucógeno, glucosa-6-fosfato y lactato musculares.

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

2.12.1. Determinación del contenido de glucógeno.

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

Se añadió una gota de indicador de pH universal a los extractos musculares para visualizar el pH del extracto y poder ajustarlo a pH 5 con diluciones de HClO₄ 10% y K₂CO₃ 5M. Los tubos que contenían los 400 μ L y la gota del indicador, se pesaron antes y después de ajustar el pH, para considerar así el grado de dilución provocado al ajustar el pH, asumiendo una densidad igual a 1. Una vez ajustado el pH a 5, se tomaron dos alícuotas de 100 μ L. A una de ellas, se le añadieron 100 μ L de solución de α -amiloglucosidasa (10 U/mL en tampón acetato sódico 0.4 M pH 4.8), mientras que a la otra se le añadieron 100 μ L de solución de tampón acetato sódico 0.4 M pH

4.8. Ambas alícuotas se incubaron durante dos horas en un baño a 50°C y se añadieron 250 mL de HClO₄ al 10% para detener la reacción. Finalmente, las muestras se centrifugaron 16000xg durante 10 minutos a 4°C y se determinó la concentración de glucosa en el sobrenadante recuperado. La cantidad de glucógeno muscular se calculó como la diferencia en la concentración de glucosa entre las muestras incubadas con α -amiloglucosidasa respecto a las que no se incubaron con α -amiloglucosidasa normalizadas por el peso en gramos de músculo.

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

Se añadió una gota de indicador de pH universal a los extractos musculares para visualizar el pH del extracto y poder ajustarlo a pH 7 con diluciones de HClO₄ 10% y K₂CO₃ 5M. Los tubos que contenían los 400 μ L y la gota del indicador, se pesaron antes y después de ajustar el pH, para determinar así el grado de dilución provocado al ajustar el pH. Una vez ajustado el pH a 7, las muestras se centrifugaron a 16000xg durante 10 minutos a 4°C y se determinó la concentración de G6P y lactato en el sobrenadante recuperado. El contenido muscular de estos metabolitos se determinó espectrofotométricamente mediante el autoanalizador PENTRA 400 de ABX. En el caso del lactato hepático, se utilizó el producto comercial *Lactic Acid* de ABX (ABX Diagnostics, Montpellier, France), mientras que para la glucosa-6-fosfato (G6P) se adaptó el método descrito por *Michal* al autoanalizador PENTRA 400 de ABX (Lang G and Michal G., 1974). Ambas cantidades se expresaron normalizadas por peso de músculo, teniendo en cuenta la dilución provocada al ajustar el pH.

2.13. Determinación del contenido de triglicéridos musculares.

Se determinó la cantidad de triglicéridos musculares utilizando el método descrito por Carr et al. (Carr et al., 1993). Los triglicéridos se extrajeron del tejido siguiendo el

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

2.14. PCR a tiempo real.

Se cuantificaron los niveles de expresión génica en músculo mediante la técnica de la PCR a tiempo real. A partir las muestras congeladas de músculo, se extrajo RNA total siguiendo el protocolo comercial del TriPure[®], como ya se ha descrito. La determinación de los niveles de expresión génica se realizó en dos pasos: un primer paso para obtener cDNA y un segundo paso consistente en la PCR a tiempo real a

partir de este cDNA. En un volumen final de 20 μ L y a partir de 1 μ g de RNA total, se obtuvo el cDNA mediante el producto comercial *Omniscript RT[®] kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). Se utilizó *oligo-dT* como cebador (*primer*) de la reacción y el producto comercial *Protector RNase Inhibitor* como inhibidor de RNasas, ambos de Roche (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany). Una vez obtenido el cDNA se determinó la expresión génica mediante PCR a tiempo real utilizando el sistema *SmartCycler II[®]* (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) y el producto comercial *QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). Cada reacción de 25 μ L contenía 2 μ L de una dilución 1:10 del cDNA, 12.5 μ L de la *QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Master mix* (MgCl₂ 2.5 mM) y el par de cebadores *forward* y *reverse* específicos para cada gen determinado, a una concentración final de 0.4 μ M. Las secuencias de los cebadores utilizadas son las siguientes:

Genes	Producto	Primer 5´ (forward)	Primer 3´ (reverse)
<i>Mlycd</i>	MCD	TTCCTGAGCAGTGGTGAGTG	AGCGGTAGTTGACCATGAGG
<i>Slc27a1</i>	FATP-1	CGCTTTCTGCGTATCGTCTG	GATGCACGGGATCGTGTCT
<i>Cpt1b</i>	M-CPT1	GCACACCAGGCAGTAGCTTT	CAGGAGTTGATTCCAGACAGGTA
<i>Ppara</i>	PPAR α	TCGGCGAACTATTCGGCTG	GCACTTGTGAAAACGGCAGT
<i>Pparg</i>	PPAR γ	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT
<i>Rps26</i>	RBS	ATTCGCTGCACG AACTGCG	CAGCAGGTCTGAATCGTGGT

Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real para determinar el nivel de expresión de los diferentes genes.

Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en las PCRs fueron: un primer ciclo de 15 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de amplificación (fase de desnaturalización: 15 segundos a 95°C; fase apareamiento oligonucleótidos: 15 segundos a 60°C; fase de extensión: 30 segundos a 72 °C). La reacción se realizó por triplicado a partir de las muestras de cDNA independientes de tres animales por grupo control y transgénico. La tecnología *SmartCycler II[®]* nos proporcionó, para cada gen

analizado, el cálculo del C_t de cada muestra por cada triplicado. El C_t corresponde al número de ciclo en que se produce el incremento significativo de la fluorescencia en la reacción, el cual es proporcional al número de moléculas de cDNA de partida. A partir de los C_t , se calculó el nivel de expresión génica de los distintos genes analizados en ambos grupos de animales mediante la fórmula matemática descrita por Pfaffl (Pfaffl, 2001). Para determinar las diferencias en la expresión génica entre los grupos experimentales, se normalizó la expresión de los distintos genes por la cantidad de cDNA total presente en cada muestra. Para determinar la cantidad de cDNA total, se determinaron los niveles de expresión de un gen *housekeeping* cuya expresión no estuviera alterada entre los diferentes grupos experimentales. En nuestro cálculo, se utilizó la expresión del gen RBS. Los resultados se expresaron como la relación entre el nivel de expresión del gen en cada grupo experimental respecto a las expresión en los animales controles, estandarizados por la expresión del gen RBS en cada uno ($\text{ratio} = 2^{-\Delta C_t \text{ gen (Con-Tg)}} / 2^{-\Delta C_t \text{ 36B4 (Con-Tg)}}$). Así, los datos se representaron como la expresión de mRNA de cada gen en cada grupo experimental relativa al nivel de expresión en los animales controles.

2.15. Determinación de parámetros séricos.

Para la obtención de suero, los animales se anestesiaron y se eutanasiaron por decapitación. Inmediatamente la sangre se recogió en tubos eppendorf no heparinizados y se coaguló mantenida en hielo. Se obtuvo el suero tras la centrifugación de la sangre coagulada a 6000xg durante 15 minutos a 4°C. Para las determinaciones séricas en que no era necesario un gran volumen de muestra se extrajeron pequeños volúmenes de sangre a partir de la vena de la cola de ratones vivos. En estos casos, a partir de animales despiertos, se extrajeron unos 100 μL de sangre procedente de la vena de la cola. Este volumen se recogió en tubos

Microvette[®] CB300 (Sarstedt, St Laurent, QC, Canada). Se centrifugaron a 6000xg durante 15 minutos a 4°C para recuperar el suero. Estas muestras se mantuvieron congelados a -20°C hasta el momento de su utilización.

2.15.1. Glucosa sanguínea.

La glucosa circulante se determinó a partir de una gota de sangre (5 µL) procedente de la cola de los ratones, mediante el sistema Glucometer Elite[®] (Bayer, Leverkusen, Germany).

2.15.2. Triglicéridos.

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

2.15.3. Insulina.

La insulina circulante se determinó en 100 µl de suero mediante radioinmunoensayo (RIA) con el producto comercial *INSULIN-CT* (CIS Bio International, Gif-Sur-Yvette,

Cedex, France). También se determinó la insulina circulante a partir de 5 μ L de suero utilizando la técnica del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), mediante el producto comercial *Rat Insulin ELISA kit* (Crystal Chemical, Chicago, IL). En este kit de ELISA, la insulina de ratón presenta una reactividad cruzada del 100%, comparada con la de rata. Los sueros procedentes de animales alimentados con la dieta HFD se diluyeron 1:3 con el diluyente de muestras proporcionado por el kit para asegurar que la concentración de insulina de las muestras estuviesen dentro del rango de detección.

2.15.4. Leptina.

La concentración de leptina sérica se determinó en 5 μ L de suero mediante ELISA con el producto comercial *Mouse Leptin ELISA kit* (Crystal Chemical, Chicago, IL). Los sueros procedentes de animales alimentados con la dieta HFD se diluyeron 1:10 con el diluyente de muestras proporcionado por el kit para asegurar que la concentración de leptina de las muestras estuviesen dentro del rango de detección.

2.15.5. Adiponectina.

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

Los niveles de adiponectina humana se determinaron mediante un ELISA específico para esta proteína (*Human adiponectin ELISA Kit*, B-Bridge, Cat. # K1001-1). Se utilizó suero humano como control positivo de la técnica. Los valores obtenidos en las muestras de las líneas de transgénicos y de controles eran similares al propio

background de la técnica debidos a la mínima reacción cruzada con la adiponectina murina, y por tanto, despreciables.

2.16. Inmunohistoquímica en células.

La capacidad de producir adiponectina murina de los AAV1 se comprobó mediante infección en placa de células HEK 293. La presencia de adiponectina murina se determinó 48 horas tras la infección con AAV1/Adpn mediante inmunohistoquímica. Para ello, las células se fijaron durante 25 minutos con una solución de 3% paraformaldehído- 2% de sacarosa en PBS previamente atemperada a 37 °C. Tras lavar 2 veces con PBS las células se permeabilizaron con una solución 0.1% de Triton X-100 en PBS durante 10 minutos. Se bloqueó la muestra con suero de cabra no inmunizado (NGS) y 1% BSA en PBS, a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo primario específico contra adiponectina murina disuelto en PBS durante 3 horas a 37°C. Tras 2 lavados con PBS las células se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado (Vector) diluido en PBS durante 1 hora. El conjunto es incubado con estreptavidina Alexa Fluor 488 conjugada con el fluorocromo FITC (Molecular Probes, S-1123). Tras volver a lavar las células con PBS se observaron las células con el microscopio de fluorescencia.

2.17. Administración de virus adenoasociados AAV-1.

La clonación del cDNA de adiponectina murina en el plásmido productor de AAV-1, la producción de los virus AAV1/Adpn y AAV1/ β gal y su titulación se realizaron en colaboración con el Vector Core de la University Hospital de Nantes. Para la generación de los AAV-1 recombinantes se utilizó el sistema de producción basado en dos plásmidos (Grimm et al., 2003). Animales controles de 3 meses de edad se anestesiaron con la solución de ketamina/ xilacina previamente descrita. Una vez

anestesiados se administraron mediante inyección intramuscular 1×10^{10} partículas víricas del AAV1 correspondiente (AAV1/Adpn o AAV1/ β gal) en cada uno de los músculos cuádriceps, gastrocnemio y tibialis de las dos extremidades posteriores. Un grupo se alimentó con dieta estándar (Harlan, 2018S) y otro grupo se alimentó con dieta alta en lípidos (TEKLAD, TD 88137, Madison, Wisconsin, USA). Los animales no fueron manipulados excepto para la toma del peso semanal y una medida de la glucemia quincenal durante las 10 primeras semanas. Al finalizar el período de dieta los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras como se ha descrito previamente.

2.18. Electrotransferencia de DNA a músculo esquelético.

Para la técnica de electrotransferencia los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de solución anestésica de ketamina/xilacina descrita previamente. Se rasuraron las extremidades posteriores con una cuchilla y se inyectaron $30 \mu\text{L}$ de un stock $0.4 \text{ U}/\mu\text{L}$ de hialuronidasa (Sigma) por músculo en los músculos cuádriceps, gastrocnemio y tibialis anterior de ambas patas traseras. Tras dos horas de actuación de la hialuronidasa, los animales se volvieron a anestesiarse con la misma solución anestésica. Se inyectaron $50 \mu\text{g}$ del plásmido correspondiente en un volumen aproximado de $35 \mu\text{L}$ de solución salina en los músculos cuádriceps, gastrocnemio y tibialis de ambas extremidades posteriores. En total, $300 \mu\text{g}$ de plásmido por animal. Las extremidades utilizadas se recubrieron con gel conductor (GELECO) y se aplicaron 10 pulsos de 20 milisegundos de $175 \text{ V}/\text{cm}$ de diámetro de la extremidad y 2 Hz utilizando un electroporador *BTX ECM 830 electroporator* (BTX, USA). Los pulsos eléctricos emitidos se corroboraron con un osciloscopio.

2.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

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

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin T, Hayden J, Reaven GM, Reaven PD (2004) Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes* 53: 585-590.

Abbud W, Habinowski S, Zhang JZ, Kendrew J, Elkairi FS, Kemp BE, Witters LA, Ismail-Beigi F (2000) Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport. *Arch Biochem Biophys* 380: 347-352.

Accili D, Cama A, Barbetti F, Kadowaki H, Kadowaki T, Taylor SI (1992) Insulin resistance due to mutations of the insulin receptor gene: an overview. *J Endocrinol Invest* 15: 857-864.

Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12: 106-109.

Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald S, Pedersen O (1993) Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342: 828-832.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, III, Johnson RS, Kahn CR (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372: 186-190.

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 (2002) 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* 105: 2893-2898.

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 (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 79-83.

Baratta R, Amato S, Degano C, Farina MG, Patane G, Vigneri R, Frittitta L (2004) Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat mass: evidence from both cross-sectional and intervention studies. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2665-2671.

Barroso I (2005) Genetics of Type 2 diabetes. *Diabet Med* 22: 517-535.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE (2001) The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7: 947-953.

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

Bray GA, York DA (1971) Genetically transmitted obesity in rodents. *Physiol Rev* 51: 598-646.

Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122-2125.

Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2: 559-569.

Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR (1997) Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88: 561-572.

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

Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B (2002) Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E834-E842.

Carr TP, Andresen CJ, Rudel LL (1993) Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem* 26: 39-42.

Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G (2005) Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia* 48: 132-139.

Celi FS, Silver K, Walston J, Knowler WC, Bogardus C, Shuldiner AR (1995) Lack of IRS-1 codon 513 and 972 polymorphism in Pima Indians. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2827-2829.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84: 491-495.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

Civitaresse AE, Jenkinson CP, Richardson D, Bajaj M, Cusi K, Kashyap S, Berria R, Belfort R, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Ravussin E (2004) Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 47: 816-820.

Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, Rasmussen S, Andersen CB, Hansen L, Almind K, Winther K, . (1995) Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 346: 397-402.

- Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE (2003) Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46: 459-469.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2001) Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108: 1875-1881.
- Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE (2003) Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52: 268-276.
- Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GR, Obici S, Deshaies Y, Ludgate M, Rossetti L, Scherer PE (2004) A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 145: 367-383.
- Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, Tanen M, Berg AH, O'Rahilly S, Savage DB, Chatterjee K, Weiss S, Larson PJ, Gottesdiener KM, Gertz BJ, Charron MJ, Scherer PE, Moller DE (2002) Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 143: 998-1007.
- Damcott CM, Ott SH, Pollin TI, Reinhart LJ, Wang J, O'connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR (2005) Genetic variation in adiponectin receptor 1 and adiponectin receptor 2 is associated with type 2 diabetes in the Old Order Amish. *Diabetes* 54: 2245-2250.
- de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7: 725-737.
- DeFronzo RA (2004) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88: 787-835, ix.
- DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E (1992) Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15: 318-368.
- Degawa-Yamauchi M, Dilts JR, Bovenkerk JE, Saha C, Pratt JH, Considine RV (2003) Lower serum adiponectin levels in African-American boys. *Obes Res* 11: 1384-1390.
- Delporte ML, Brichard SM, Hermans MP, Beguin C, Lambert M (2003) Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58: 22-29.
- Delporte ML, El Mkaem SA, Quisquater M, Brichard SM (2004) Leptin treatment markedly increased plasma adiponectin but barely decreased plasma resistin of ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E446-E453.
- Devedjian JC, George M, Casellas A, Pujol A, Visa J, Pelegrin M, Gros L, Bosch F (2000) Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J Clin Invest* 105: 731-740.

Dumke CL, Wetter AC, Arias EB, Kahn CR, Cartee GD (2001) Absence of insulin receptor substrate-1 expression does not alter GLUT1 or GLUT4 abundance or contraction-stimulated glucose uptake by mouse skeletal muscle. *Horm Metab Res* 33: 696-700.

Dusserre E, Moulin P, Vidal H (2000) Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 1500: 88-96.

Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K (2003) Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1594-1602.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R (2002) Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1084-1089.

Fasshauer M, Klein J, Ueki K, Kriauciunas KM, Benito M, White MF, Kahn CR (2000) Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of Glut4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem* 275: 25494-25501.

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

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

Fisher FM, McTernan PG, Valsamakis G, Chetty R, Harte AL, Anwar AJ, Starcynski J, Crocker J, Barnett AH, McTernan CL, Kumar S (2002) Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res* 34: 650-654.

FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.

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

Franckhauser S, Munoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P, Su B, Bosch F (2002) Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* 51: 624-630.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 847-850.

Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.

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

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I (2005) Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307: 426-430.

Gavrila A, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller LC, Orlova C, Mantzoros CS (2003) Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4823-4831.

Gazdag AC, Dumke CL, Kahn CR, Cartee GD (1999) Calorie restriction increases insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle from IRS-1 knockout mice. *Diabetes* 48: 1930-1936.

Gil-Campos M, Canete RR, Gil A (2004) Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* 23: 963-974.

Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL (1995) Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 95: 2195-2204.

Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA (2003) Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther* 7: 839-850.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546.

Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brichard SM (2001) Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 1102-1107.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.

Hansen L, Pedersen O (2005) Genetics of type 2 diabetes mellitus: status and perspectives. *Diabetes Obes Metab* 7: 122-135.

Hansen L, Zethelius B, Berglund L, Reneland R, Hansen T, Berne C, Lithell H, Hemmings BA, Pedersen O (2001) In vitro and in vivo studies of a naturally occurring variant of the human p85 α regulatory subunit of the phosphoinositide 3-kinase: inhibition of protein kinase B and relationships with type 2 diabetes, insulin secretion, glucose disappearance constant, and insulin sensitivity. *Diabetes* 50: 690-693.

- Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M, Shimazu T (1999) Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* 48: 1706-1712.
- Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A (2002) Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2395.
- 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 (2000) Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1595-1599.
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y (2001) 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* 50: 1126-1133.
- Hotta K, Gustafson TA, Yoshioka S, Ortmeyer HK, Bodkin NL, Hansen BC (1998) Relationships of PPAR γ and PPAR γ 2 mRNA levels to obesity, diabetes and hyperinsulinaemia in rhesus monkeys. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 1000-1010.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271: 10697-10703.
- Hug C, Lodish HF (2005) *Medicine*. Visfatin: a new adipokine. *Science* 307: 366-367.
- Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF (2004) T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10308-10313.
- Hulthe J, Hulten LM, Fagerberg B (2003) Low adipocyte-derived plasma protein adiponectin concentrations are associated with the metabolic syndrome and small dense low-density lipoprotein particles: atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism* 52: 1612-1614.
- Hulver MW, Saleh O, MacDonald KG, Pories WJ, Barakat HA (2004) Ethnic differences in adiponectin levels. *Metabolism* 53: 1-3.
- Igel M, Becker W, Herberg L, Joost HG (1997) Hyperleptinemia, leptin resistance, and polymorphic leptin receptor in the New Zealand obese mouse. *Endocrinology* 138: 4234-4239.
- Imagawa A, Funahashi T, Nakamura T, Moriwaki M, Tanaka S, Nishizawa H, Sayama K, Uno S, Iwahashi H, Yamagata K, Miyagawa J, Matsuzawa Y (2002) Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25: 1665-1666.
- Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I (2003) Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52: 1655-1663.

- Kahn CR, Vicent D, Doria A (1996) Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 47: 509-531.
- Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ (1997) Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389: 374-377.
- Kazumi T, Kawaguchi A, Sakai K, Hirano T, Yoshino G (2002) Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure. *Diabetes Care* 25: 971-976.
- Keppler D., Decker K. (1974) Glycogen: determination with amyloglucosidase. In: *In: Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H.U., ed), pp 1127-1131. London, UK: Academic Press.
- Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G (2003) Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 52: 1779-1785.
- Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M (2003) Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 1118-1122.
- Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D (2000) Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 105: 199-205.
- Kim JK, Michael MD, Previs SF, Peroni OD, Mauvais-Jarvis F, Neschen S, Kahn BB, Kahn CR, Shulman GI (2000) Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 105: 1791-1797.
- Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB (1999) Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 104: 733-741.
- Kojima S, Funahashi T, Sakamoto T, Miyamoto S, Soejima H, Hokamaki J, Kajiwara I, Sugiyama S, Yoshimura M, Fujimoto K, Miyao Y, Suefuji H, Kitagawa A, Ouchi N, Kihara S, Matsuzawa Y, Ogawa H (2003) The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction. *Heart* 89: 667.
- Kosmiski L, Kuritzkes D, Lichtenstein K, Eckel R (2003) Adipocyte-derived hormone levels in HIV lipodystrophy. *Antivir Ther* 8: 9-15.
- Kraegen EW, James DE, Storlien LH, Burleigh KM, Chisholm DJ (1986) In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia* 29: 192-198.
- 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 (2002) Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277: 25863-25866.

- Kulkarni RN, Almind K, Goren HJ, Winnay JN, Ueki K, Okada T, Kahn CR (2003) Impact of genetic background on development of hyperinsulinemia and diabetes in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 double heterozygous mice. *Diabetes* 52: 1528-1534.
- Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR (1999) Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96: 329-339.
- Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y (2003) Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 85-89.
- Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW (1999) 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48: 1667-1671.
- Lackner R, Challiss RA, West D, Newsholme EA (1984) A problem in the radiochemical assay of glucose-6-phosphatase in muscle. *Biochem J* 218: 649-651.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lang G, Michal G. (1974) D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphatase. In: *In: Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H., ed), pp 1238-1242. New York: Academic Press.
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635.
- Li J, Yu X, Pan W, Unger RH (2002) Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1334-E1341.
- Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B (2004) Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol* 219: 9-15.
- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J (2002) Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 360: 57-58.
- Lopez IP, Milagro FI, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, De Miguel C (2004) Gene expression changes in rat white adipose tissue after a high-fat diet determined by differential display. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 234-239.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221: 286-289.

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 (2002) Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8: 731-737.

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 (2001) PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50: 2094-2099.

Malecki MT (2005) Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 68 Suppl1: S10-S21.

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 (2002) Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 277: 37487-37491.

Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR (2000) Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6: 87-97.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-343.

Moller DE (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414: 821-827.

Moller DE, Cohen O, Yamaguchi Y, Assiz R, Grigorescu F, Eberle A, Morrow LA, Moses AC, Flier JS (1994) Prevalence of mutations in the insulin receptor gene in subjects with features of the type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* 43: 247-255.

Moller DE, Yokota A, White MF, Pazianos AG, Flier JS (1990) A naturally occurring mutation of insulin receptor alanine 1134 impairs tyrosine kinase function and is associated with dominantly inherited insulin resistance. *J Biol Chem* 265: 14979-14985.

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

Mori H, Hashiramoto M, Kishimoto M, Kasuga M (1995) Amino acid polymorphisms of the insulin receptor substrate-1 in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2822-2826.

Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, Rosato FE, Goldstein BJ (2002) Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5662-5667.

Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Jr., Tapscott EB, Coleman RA, Dohn GL (1997) Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46: 1360-1363.

Mynarcik DC, Combs T, McNurlan MA, Scherer PE, Komaroff E, Gelato MC (2002) Adiponectin and leptin levels in HIV-infected subjects with insulin resistance and body fat redistribution. *J Acquir Immune Defic Syndr* 31: 514-520.

Nagy A. (2002) *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M (1996) Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 120: 803-812.

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 (2000) An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res* 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 (2002) Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106: 2767-2770.

Ong KK, Dunger DB (2000) Thrifty genotypes and phenotypes in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 6: 1419-1424.

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 (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100: 2473-2476.

Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE (2003) Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278: 9073-9085.

Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE (2004) Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279: 12152-12162.

Pannacciulli N, Vettor R, Milan G, Granzotto M, Catucci A, Federspil G, De Giacomo P, Giorgino R, De Pergola G (2003) Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1748-1752.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543.

- Pender C, Goldfine ID, Tanner CJ, Pories WJ, MacDonald KG, Havel PJ, Houmard JA, Youngren JF (2004) Muscle insulin receptor concentrations in obese patients post bariatric surgery: relationship to hyperinsulinemia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 363-369.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF (1996) Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 13: 18-19.
- Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB (2004) Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 291: 1730-1737.
- Prentice AM, Rayco-Solon P, Moore SE (2005) Insights from the developing world: thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Proc Nutr Soc* 64: 153-161.
- Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI (2000) Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem* 275: 38990-38994.
- Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS (2004) Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 10: 524-529.
- Ranheim T, Haugen F, Staff AC, Braekke K, Harsem NK, Drevon CA (2004) Adiponectin is reduced in gestational diabetes mellitus in normal weight women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83: 341-347.
- Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N, Connelly PW, Sermer M, Zinman B (2004) Hypoadiponectinaemia in South Asian women during pregnancy: evidence of ethnic variation in adiponectin concentration. *Diabet Med* 21: 388-392.
- Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U (1997) Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4171-4175.
- Russell RR, III, Bergeron R, Shulman GI, Young LH (1999) Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol* 277: H643-H649.
- Salmon DM, Flatt JP (1985) Effect of dietary fat content on the incidence of obesity among ad libitum fed mice. *Int J Obes* 9: 443-449.
- Sato C, Yasukawa Z, Honda N, Matsuda T, Kitajima K (2001) Identification and adipocyte differentiation-dependent expression of the unique disialic acid residue in an adipose tissue-specific glycoprotein, adipo Q. *J Biol Chem* 276: 28849-28856.
- Satoh H, Nguyen MT, Trujillo M, Imamura T, Usui I, Scherer PE, Olefsky JM (2005) Adenovirus-mediated adiponectin expression augments skeletal muscle insulin sensitivity in male Wistar rats. *Diabetes* 54: 1304-1313.

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

Schmid GM, Converset V, Walter N, Sennitt MV, Leung KY, Byers H, Ward M, Hochstrasser DF, Cawthorne MA, Sanchez JC (2004) Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice. *Proteomics* 4: 2270-2282.

Shapiro L, Scherer PE (1998) The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 8: 335-338.

Shirakami A, Toyonaga T, Tsuruzoe K, Shirotani T, Matsumoto K, Yoshizato K, Kawashima J, Hirashima Y, Miyamura N, Kahn CR, Araki E (2002) Heterozygous knockout of the IRS-1 gene in mice enhances obesity-linked insulin resistance: a possible model for the development of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 174: 309-319.

Shklyayev S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, Scarpace PJ, Zolotukhin S (2003) Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14217-14222.

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

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

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF (2003) Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361: 226-228.

Statnick MA, Beavers LS, Conner LJ, Corominola H, Johnson D, Hammond CD, Rafaeloff-Phail R, Seng T, Suter TM, Sluka JP, Ravussin E, Gadski RA, Caro JF (2000) Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* 1: 81-88.

Stefan N, Stumvoll M, Vozarova B, Weyer C, Funahashi T, Matsuzawa Y, Bogardus C, Tataranni PA (2003) Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans. *Diabetes Care* 26: 3315-3319.

Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA (2002) Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 51: 1884-1888.

Stern MP (2000) Strategies and prospects for finding insulin resistance genes. *J Clin Invest* 106: 323-327.

Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW (1986) Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol* 251: E576-E583.

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

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 (2000) Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 861-868.

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, . (1994) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372: 182-186.

Tan GD, Debard C, Funahashi T, Humphreys SM, Matsuzawa Y, Frayn KN, Karpe F, Vidal H (2005) Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy. *Diabetologia* 48: 1585-1589.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.

Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CC, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB (2002) Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16309-16313.

Trujillo ME, Scherer PE (2005) Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 257: 167-175.

Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF (2002) Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem* 277: 29359-29362.

Ueno N, Dube MG, Inui A, Kalra PS, Kalra SP (2004) Leptin modulates orexigenic effects of ghrelin and attenuates adiponectin and insulin levels and selectively the dark-phase feeding as revealed by central leptin gene therapy. *Endocrinology* 145: 4176-4184.

Unger RH (2002) Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 53: 319-336.

Ura S, Araki E, Kishikawa H, Shirotani T, Todaka M, Isami S, Shimoda S, Yoshimura R, Matsuda K, Motoyoshi S, Miyamura N, Kahn CR, Shichiri M (1996) Molecular scanning of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Japanese patients with NIDDM: identification of five novel polymorphisms. *Diabetologia* 39: 600-608.

Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F (1994) Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9151-9154.

Vasseur F, Lepretre F, Lacquemant C, Froguel P (2003) The genetics of adiponectin. *Curr Diab Rep* 3: 151-158.

- Vionnet N, Hani E, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, De Matos F, Durand E, Lepretre F, Lecoeur C, Gallina P, Zekiri L, Dina C, Froguel P (2000) Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet* 67: 1470-1480.
- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103: 931-943.
- Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, Kadowaki T (2005) Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 146: 790-796.
- Wang H, Zhang H, Jia Y, Zhang Z, Craig R, Wang X, Elbein SC (2004) Adiponectin receptor 1 gene (ADIPOR1) as a candidate for type 2 diabetes and insulin resistance. *Diabetes* 53: 2132-2136.
- Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GJ (2002) Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem* 277: 19521-19529.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1930-1935.
- Whitehead JP, Humphreys P, Krook A, Jackson R, Hayward A, Lewis H, Siddle K, O'Rahilly S (1998) Molecular scanning of the insulin receptor substrate 1 gene in subjects with severe insulin resistance: detection and functional analysis of a naturally occurring mutation in a YMXM motif. *Diabetes* 47: 837-839.
- Winzell MS, Ahren B (2004) The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3: S215-S219.
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391: 900-904.
- Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Nishikai K, Saruta T (2002) Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)* 103: 137-142.
- 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 (2003a) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769.

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 (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, 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 (2003b) Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 278: 2461-2468.

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 (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-946.

Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T (1996) Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 16: 3074-3084.

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM (2001) Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3815-3819.

Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y (2000) Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 96: 1723-1732.

Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, Olefsky JM (2002) The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 51: 2968-2974.

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

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