

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**PAPEL DEL LOCUS *Ink4/Arf* Y DEL SUSTRATO 2
DEL RECEPTOR DE LA INSULINA (IRS2) EN LA
DIABETES Y LA ATEROSCLEROSIS**

TESIS DOCTORAL

MARÍA ÁNGELA VINUÉ VISÚS



Centro Nacional de Investigaciones
Cardiovasculares



Fundación Investigación
Clínica de Valencia



Instituto de Biomedicina de
Valencia



Centro Nacional de Investigaciones
Cardiovasculares



Fundación Investigación
Clínica de Valencia

D. Vicente Andrés García, Investigador del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares y **Dña. Herminia González Navarro**, Investigadora de la Fundación del Hospital Clínico Universitario de Valencia, INCLIVA,

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado PAPEL DEL LOCUS *Ink4/Arf* Y DEL SUSTRATO 2 DEL RECEPTOR DE LA INSULINA (IRS2) EN LA DIABETES Y LA ATROSCLEROSIS, presentado por Dña. María Ángela Vinué Visús, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha sido realizado en el IBV/CSIC, CNIC, INCLIVA bajo su dirección para obtener el grado de Doctor.

Valencia, 17 de Mayo de 2013

Firmado: Vicente Andrés García

Firmado: Herminia González Navarro

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por las siguientes ayudas:

Título: Factores de riesgo, evolución y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y sus mecanismos moleculares y celulares (RETIC en Enfermedades Cardiovasculares, RECAVA, RD06/0014/0021)

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III

Investigador responsable: Vicente Andrés

Título: Mecanismos moleculares y genéticos de la enfermedad cardiovascular y el envejecimiento: Abordajes básicos y clínicos (SAF2010-16044)

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación

Investigador responsable: Vicente Andrés

Título: Papel de la Lipasa Hepática en el desarrollo de la aterosclerosis inducida por Diabetes Mellitus tipo 2 y Síndrome Metabólico. (PINV asociado CP10/00555)

Entidad financiadora: ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación

Investigador responsable: Herminia González

Título: Mecanismos moleculares de la aterosclerosis acelerada por hipercolesterolemia y diabetes tipo 2.

Entidad financiadora: Generalitat Valenciana GV/2007/164. 2007-2008

Investigador responsable: Herminia González

A mis padres,
Por su esfuerzo, sacrificio y cariño
Gracias

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizado este trabajo, quiero expresar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la consecución del mismo.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, Vicente Andrés y Herminia González, por la oportunidad que me dieron para poder realizar este trabajo. Agradecer sus enseñanzas, confianza y, sobre todo, su paciencia para que esta tesis llegase a buen puerto.

A María Jesús, José Javier, Ana, Davinia, Mariam, Rosa, José María, Carlos, Pedro, Silvia, Yafa, Mariló y todos aquellos que compartimos el día a día en el laboratorio de Biología Vascul ar del IBV con quienes me inicié en este mundo tan desconocido para mí y que tanto me ayudaron con su experiencia.

A María Jesús Sanz, Cris, Paula, Virginia y Laura, que me hicieron un hueco en la Facultad de Medicina dándome todo su apoyo.

A Laura e Irene con quienes comienzo una nueva etapa en el INCLIVA y con las que espero seguir ordenando mis ideas durante mucho tiempo.

Gracias a todos los compañeros del IBV, científicos y no científicos, que me echaron una mano cuando la necesité y que contribuyeron a hacer francamente fácil mi etapa en el centro. Un hueco especial dejo para José Cubells, que supo ver algo en mí y con el que compartir animalario día a día fue un verdadero placer.

A mis hermanos, que sin tener realmente muy claro a qué me he dedicado estos últimos años, algo han preguntado. Espero que esta tesis les aporte alguna idea más.

Y a Dani, por todo, gracias.

Gracias a todos

María Ángela Vinué Visús

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	15
INTRODUCCIÓN	17
1. Aterosclerosis	19
1.1. Incidencia de las enfermedades cardiovasculares	19
1.2. Estructura de la pared arterial	19
1.3. Alteraciones de la homeostasis de la pared vascular: la aterosclerosis	20
1.4. Inicio y evolución de la aterosclerosis	21
1.5. Vulnerabilidad y estabilidad de la placa	24
2. Factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular (ECV): diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y síndrome metabólico (SM)	28
2.1. Generalidades y definición de DMT2 y SM	28
2.2. La dislipidemia diabética	31
2.3. Efectos de la DMT2 y del SM en la ECV	32
3. Papel del sustrato del receptor de la insulina 2 (IRS2) en la señalización de la insulina	35
3.1. Vía de señalización PI3K	38
3.2. Vía de señalización de las MAPK	39
4. Modelos murinos de aterosclerosis, DMT2/SM y aterosclerosis acelerada por DMT2/SM	40
4.1. El ratón deficiente en apolipoproteína E como modelo de hipercolesterolemia y aterosclerosis	40
4.2. El ratón deficiente en IRS2 y el ratón doble deficiente en IRS2 y apoE: modelos murinos de DMT2/SM y de aterosclerosis acelerada por DMT2/SM	41
5. Papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en el ciclo celular y en las enfermedades metabólicas	44
5.1. El ciclo celular. Generalidades	44
5.1.1. Regulación del ciclo celular: ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas	45
5.1.2. Regulación del ciclo celular: inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas	46

5.2. El locus <i>Ink4/Arf</i>	48
5.2.1. Estructura génica del locus <i>Ink4/Arf</i>	48
5.2.2. Papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en el ciclo celular, senescencia y apoptosis	49
5.2.3. Regulación del locus <i>Ink4/Arf</i> : activadores y represores de su expresión	52
5.3. Estudios de asociación genética a gran escala en el locus <i>Ink4/Arf</i>	53
5.4. Papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en el envejecimiento: el ratón transgénico <i>Super-Ink4/Arf</i>	54
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. Estudios <i>in vivo</i> en ratones	63
1.1. Ratones, genotipado y dietas	63
1.2. Medidas metabólicas en ratones	64
1.2.1. Determinación de lípidos circulantes en plasma	64
1.2.2. Estudios de tolerancia a la glucosa y determinación de glucosa e insulina	65
1.2.3. Estudios de tolerancia a la insulina	66
1.3. Obtención y procesamiento de tejidos de ratón para el análisis histopatológico	66
1.4. Cuantificación de la aterosclerosis	68
1.4.1. Cuantificación del tamaño de la placa aterosclerótica <i>en face</i> en el cayado aórtico y en la aorta torácica	68
1.4.2. Cuantificación de la aterosclerosis en el seno aórtico e inicio de aorta.	68
1.5. Caracterización de la composición de la placa de ateroma	69
1.5.1. Cuantificación del contenido en macrófagos en la placa de ateroma	69
1.5.2. Cuantificación del contenido en células de músculo liso vascular (cMLVs) en la placa de ateroma	70
1.5.3. Cuantificación del contenido en colágeno en la placa de ateroma	70

1.6. Caracterización inmunohistológica del páncreas de ratón	71
1.6.1. Cuantificación de islotes pancreáticos	72
1.6.2. Cuantificación de la proliferación y de la apoptosis en islotes pancreáticos	72
1.6.3. Cuantificación de p15 ^{INK4b} , p16 ^{INK4a} y p19 ^{ARF} en islotes pancreáticos	73
1.7. Aislamiento de islotes pancreáticos	74
1.8. Experimentos de señalización de insulina	75
1.9. Experimentos de captación de glucosa de músculo sóleo mediante PET-CT	75
2. Estudios <i>in vitro</i> en cultivos celulares	77
2.1. Obtención de cultivos primarios de ratón y de rata	77
2.1.1. Obtención de macrófagos derivados de médula ósea de ratón	77
2.1.2. Obtención de cMLVs de ratón y de rata	77
2.2. Ensayos funcionales <i>in vitro</i>	78
2.2.1. Estudios de captación de LDL acetiladas	78
2.2.2. Análisis de la apoptosis	79
2.3. Estudios de inhibición en cMLVs de rata	79
3. Estudios de expresión de proteínas mediante Western Blot	80
3.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos	80
3.2. Experimentos de co-inmunoprecipitación	81
3.3. Análisis de la expresión proteica mediante SDS-PAGE y Western Blot	81
4. Estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	84
4.1. Obtención y cuantificación de extractos de ARN	84
4.2. Retrotranscripción del ARN y análisis de la expresión génica por qPCR	84
5. Estudios en pacientes	86
5.1. Características clínicas de los pacientes	86
5.2. Obtención y análisis de la expresión génica en células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)	87

6. Análisis estadísticos	88
RESULTADOS	89
1. Estudio de los efectos de la disminución en la ruta de señalización por insulina mediados por IRS2	91
1.1. Análisis de la señalización de <i>Irs2</i> en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con SM con y sin resistencia a insulina	93
1.1.1. La RI en pacientes con SM se asocia con la presencia de factores de riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares	95
1.1.2. Estudio de la expresión de los componentes de la vía de señalización de la insulina en CMSPs	96
1.1.3. La expresión de <i>Irs2</i> y <i>Akt2</i> se correlaciona inversamente con los niveles de insulina e índice HOMA en pacientes SM-RI pero no en pacientes SM-SI	98
1.2. Estudio del efecto de la inactivación parcial de <i>Irs2</i> en modelos murinos de hipercolesterolemia y aterosclerosis en el desarrollo de la placa de ateroma y en cambios de la expresión génica	101
1.2.1. En ratones <i>apoE</i> ^{-/-} la inactivación parcial de <i>Irs2</i> combinada con hipercolesterolemia grave produce intolerancia a la glucosa y una leve hiperinsulinemia	103
1.2.2. El metabolismo lipídico en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} no se ve afectado por la eliminación de un alelo de <i>Irs2</i>	106
1.2.3. La inactivación parcial de <i>Irs2</i> en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} combinada con hipercolesterolemia grave acelera la aterosclerosis sin cambios en la composición de la placa de ateroma	107
1.2.4. La inactivación de un alelo de <i>Irs2</i> se asocia con un aumento en la captación de LDLac y un aumento en la expresión de receptores <i>scavenger</i> en los macrófagos	109
1.2.5. Estudios de la expresión en el cayado aórtico	110
1.2.6. La disrupción de la señalización de la insulina mediada por <i>Irs2</i> y sus efectores intracelulares induce la expresión de la citoquina proaterogénica <i>Mcp1</i>	112
1.2.7. El bloqueo de la ruta de la señalización de la insulina induce la secreción de la citoquina proaterogénica <i>Mcp1</i>	113
2. Estudio del papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en el desarrollo de resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa asociada a la edad	115
2.1. Estudio del papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en cambios de la homeostasis de la glucosa y de la insulina asociada a la edad	117
2.1.1. Los ratones <i>Super-Ink4/Arf</i> muestran un aumento moderado en la expresión de p16 ^{INK4a} , p15 ^{INK4b} y p19 ^{ARF} en hígado	119

2.1.2. La presencia de una copia extra del locus <i>Ink4/Arf</i> protege frente a trastornos de la glucosa y de la insulina	121
2.1.3. Una copia extra del locus <i>Ink4/Arf</i> no produce cambios en el metabolismo lipídico	122
2.1.4. Una copia extra del locus <i>Ink4/Arf</i> previene la intolerancia a la glucosa asociada al envejecimiento	123
2.1.5. La presencia de una dosis extra del locus <i>Ink4/Arf</i> mejora la sensibilidad a la insulina	125
2.1.6. Una dosis extra de <i>Ink4/Arf</i> aumenta la captación de glucosa en músculo esquelético	126
2.2. Estudio del papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en la funcionalidad de las células β -pancreáticas en ratones <i>Super-Ink4/Arf</i>	129
2.2.1. El aumento de la dosis del locus <i>Ink4/Arf</i> no afecta ni al número de islotes pancreáticos ni al área ocupada por células β -pancreáticas	131
2.2.2. El aumento de la dosis de <i>Ink4/Arf</i> no afecta ni a la proliferación ni a la apoptosis de células β -pancreáticas	132
2.2.3. El aumento de la dosis de <i>Ink4/Arf</i> con la edad no se asocia a un aumento de p15 ^{INK4b} , p16 ^{INK4a} y p19 ^{ARF} en células β -pancreáticas	133
2.3. Estudio del papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en la señalización de la insulina en tejidos diana	135
2.3.1. Los ratones <i>Super-Ink4/Arf</i> presentan un incremento en la señalización por insulina en hígado	137
2.3.2. Los ratones <i>Super-Ink4/Arf</i> presentan un incremento en la señalización por insulina en tejidos periféricos	139
DISCUSIÓN	143
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	159

ABREVIATURAS

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1
Akt	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog kinase</i>
ANRIL	ARN no codificante antisentido en el locus INK4 (<i>antisense noncoding RNA in the INK4 locus</i>)
apoE	Apolipoproteína E
ARF	Marco de lectura alternativo (<i>alternative reading frame</i>)
ARF-BP1/Mule	ARF binding protein 1/Mcl1-ubiquitin ligase E3
AUC	Área debajo de la curva (<i>area under the curve</i>)
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (<i>cyclin dependent kinase</i>)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CDKN2BAS	CDKN2B antisense
c-HDL	Colesterol HDL
Cip-Kip	CDK interacting protein / kinase inhibitory protein
CKI	Inhibidor de CDK (<i>cyclin kinase inhibitor</i>)
cMLVs	Células de músculo liso vascular
CMSPs	Células mononucleares de sangre periférica
CT	Tomografía computerizada (<i>computer tomography</i>)
c-TOTAL	Colesterol total
DAB	Diaminobencidina
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
eNOS	Sintasa endotelial de óxido nítrico (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FBS	Suero bovino fetal (<i>fetal bovine serum</i>)
¹⁸F-FDG	¹⁸Fluor-Fluorodeoxyglucose
GLUT	Proteína transportadora de glucosa (glucose transporter)
GRB2	Proteína del receptor del factor de crecimiento 2 (growth factor receptor-bound protein 2)
GWA	Estudios de asociación genética (genome-wide association)

Abreviaturas

HBSS	Solución balanceada de Hank (Hank's balanced salt solution)
HDL	Lipoproteína de alta densidad (high density lipoprotein)
HOMA	Evaluación del modelo homeostático (homeostasis model assesment)
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1 (intercellular adhesion molecule-1)
IFN-γ	Interferón γ
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de masa corporal
INK4	Inhibidor de CDK4 (inhibitors of CDK4)
IRS	Sustrato del receptor de la insulina (insulin receptor substrate)
LCM	L929-cell conditioned medium
LDL	Lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein)
LDLac	LDL acetilada
LDLmo	LDL modificada
LDLox	LDL oxidada
MAPK	Quinasa activada por mitógenos (mitogen-activated protein kinase)
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1 (monocyte chemotactic protein 1)
MCSF	Factor de estimulación de colonias de macrófagos (macrophage colony stimulation factor)
MDM2	Murine doble minute 2
MDMO	Macrófagos derivados de médula ósea
MEK	Quinasa regulada por mitógenos (mitogen extracellular signal-regulated kinase)
MMP	Metaloproteínasa de matriz (matrix metalloproteinase)
MTS1	Supresor múltiple de tumores 1 (multiple tumor suppressor 1)
MTS2	Supresor múltiple de tumores 2 (multiple tumor suppressor 2)
NF-κB	Factor nuclear- kappa β (Nuclear factor-kappaB)
NO	Óxido nítrico (nitric oxide)
OMS	Organización mundial de la salud
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PDK1	Phosphatidylinositol Dependent Kinase 1

PET	Tomografía por emisión de positrones (<i>positron emission tomography</i>)
PFA	Paraformaldehído
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PIP₃	Fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato (<i>phosphatidylinositol 3, 4, 5 phosphate</i>)
PTB	Dominio de unión tirosina (<i>protein tyrosine-binding</i>)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
pRb	Proteína del retinoblastoma
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RAS	<i>Retrovirus associated sequences</i>
RI	Resistencia a la insulina
R-INS	Receptor de la insulina
ROS	Especies reactivas del oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
sdLDL	LDL pequeñas y densas (<i>small dense LDL</i>)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH	<i>Src homology</i>
SM	Síndrome metabólico
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)
SOS	<i>Son of sevenless</i>
SUV	Valor de captación estándar (<i>standard uptake valued</i>)
TAG	Triacilglicéridos
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β (<i>transforming growth factor β</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TPBS	<i>Tween-20 Phosphate buffered saline</i>
TTG	Test de tolerancia a la glucosa
TTI	Test de tolerancia a la insulina
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1 (<i>vascular cell adhesión molecule-1</i>)
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad (<i>very low density lipoprotein</i>)
VOI	Volumen de interés (<i>volume of interest</i>)
WB	Western Blot
WT	Silvestre (<i>wild type</i>)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la pared arterial	20
Figura 2	Procesos aterogénicos que inician la formación de la estría grasa	22
Figura 3	Progresión de la lesión y formación de la capa fibrosa	23
Figura 4	Vulnerabilidad de la placa	24
Figura 5	Posible papel del estrés del retículo endoplásmico en la progresión de la lesión aterosclerótica	25
Figura 6	Ruptura de la placa y trombosis	27
Figura 7	RI y su relación con la ECV y la DMT2	29
Figura 8	Patogenia de la DMT2	30
Figura 9	Cambios en el metabolismo lipídico en la DMT2 y en el SM	31
Figura 10	Disfunción endotelial en la DMT2 y desarrollo de aterosclerosis	34
Figura 11	Estructura del R-INS	35
Figura 12	Activación de las vías de señalización de la insulina	36
Figura 13	Activación de la vía PI3K por acción de la insulina	39
Figura 14	Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina	39
Figura 15	Perfil de lipoproteínas en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} y <i>WT</i>	41
Figura 16	Aterosclerosis en modelos murinos de DMT2/SM, aterosclerosis y aterosclerosis acelerada por DMT2/SM	43
Figura 17	Correlación entre los niveles de insulina en plasma y el tamaño de la placa de ateroma	43
Figura 18	Fases del ciclo celular y punto de restricción	44
Figura 19	Ciclinas y CDKs implicadas en la regulación del ciclo celular	46
Figura 20	Localización cromosómica de los genes INK4	47
Figura 21	Regulación del ciclo celular en la fase G1 por CKIs	47
Figura 22	Estructura del locus <i>Ink4/Arf</i>	48
Figura 23	Organización genómica de CDKN2A/B y ANRIL	49
Figura 24	Modulación del ciclo celular mediada por los productos génicos del locus <i>Ink4/Arf</i> .	50
Figura 25	Papel de ARF en el ciclo celular mediada por p53 y p21 ^{Cip1}	51
Figura 26	Activadores y represores de la expresión del locus <i>Ink4/Arf</i>	53
Figura 27	Principales SNPs asociados a ECV y DMT2	54
Figura 28	Estructura del transgén utilizado para la generación de los ratones <i>Super-Ink4/Arf</i> .	55
Figura 29	Anatomía de la arteria aorta	67

Figura 30	Estudio de la expresión mediante qPCR de los niveles de ARNm de los efectores intracelulares del receptor de la insulina en CMSPs.	97
Figura 31	Correlación entre la expresión de los genes <i>Irs2</i> y <i>Akt2</i>	97
Figura 32	Expresión de los genes <i>Erk2</i> , <i>Hras1</i> y <i>Rras</i>	98
Figura 33	Análisis de regresión de los niveles de ARNm de <i>Irs2</i> y <i>Akt2</i>	99
Figura 34	Niveles plasmáticos de glucosa e insulina y peso corporal de ratones <i>apoE</i> ^{-/-} vs <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i>	104
Figura 35	Test de tolerancia a la glucosa (TTG) y análisis de la secreción de insulina en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} alimentados con dieta control y dieta aterogénica	105
Figura 36	Niveles plasmáticos de c-Total, c-HDL y TAG en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	106
Figura 37	Análisis de la aterosclerosis en el arco aórtico <i>en face</i> de ratones <i>apoE</i> ^{-/-} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	107
Figura 38	Caracterización de la composición de la placa de ateroma en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	108
Figura 39	Captación de LDLac y expresión de receptores <i>scavenger</i> en MDMO	109
Figura 40	Niveles de expresión de genes de la señalización de la insulina alterados en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-}	111
Figura 41	Análisis de la composición y del tamaño de la placa de ateroma en ratones alimentados durante 2 meses con dieta aterogénica	112
Figura 42	Expresión de <i>Mcp1</i> en cayado aórtico y en cultivos primarios de cMLVs y de MDMO	113
Figura 43	Efecto de la inhibición farmacológica de las quinasas AKT y ERK1/2 en los niveles de expresión de <i>Mcp1</i> y en los niveles proteicos de sus formas activadas	114
Figura 44	Efecto de la inhibición farmacológica de las quinasas AKT y ERK1/2 sobre sus efectores intracelulares en cMLVs	114
Figura 45	Expresión del locus <i>Ink4/Arf</i> en ratones <i>Super-Ink4/Arf</i> y <i>WT</i> de 1 año de edad	120
Figura 46	Ensayo de la funcionalidad del locus <i>Ink4/Arf</i>	121
Figura 47	Efecto de la edad y del aumento de la dosis de <i>Ink4/Arf</i> sobre los niveles de glucosa e insulina plasmática y el peso corporal	122
Figura 48	Efecto de la edad y del aumento de la dosis de <i>Ink4/Arf</i> en los niveles plasmáticos de colesterol	122
Figura 49	Análisis de la tolerancia a la glucosa mediante TTG en ratones <i>WT</i> y <i>Super-Ink4/Arf</i>	124
Figura 50	Análisis de la sensibilidad a insulina mediante TTI	125

Figura 51	Efecto del incremento de la dosis génica de <i>Ink4/Arf</i> en la captación <i>in vivo</i> de ¹⁸ F-FDG en músculo esquelético	127
Figura 52	Análisis del número de islotes pancreáticos y del área ocupada por células β-pancreáticas en ratones <i>WT</i> y <i>Super-Ink4/Arf</i> de 0.5 y 1 año de edad	131
Figura 53	Análisis de la proliferación y de la apoptosis en páncreas	132
Figura 54	Análisis de la expresión de p15 ^{INK4b} , p16 ^{INK4a} y p19 ^{ARF} en células β-pancreáticas	133
Figura 55	Análisis de la señalización de la insulina <i>in vivo</i> en ratones <i>WT</i> y <i>Super-Ink4/Arf</i> de 1 año de edad	138
Figura 56	Análisis de expresión de IRS1 e IRS2 en hígado tras estimulación por insulina	139
Figura 57	Análisis de la activación <i>in vivo</i> de los efectores intracelulares de la insulina AKT1/2 en músculo esquelético y corazón tras estimulación con insulina	140
Figura 58	Análisis de la activación <i>in vivo</i> de JNK en músculo esquelético y corazón tras estimulación por insulina	141
Figura 59	Hipótesis planteada sobre mecanismos de aterosclerosis acelerada en estados de SM y RI.	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Criterios diagnósticos de SM propuestos por el “Program Adult Treatment Panel III (ATP III)”	28
Tabla 2	Alteraciones proaterogénicas y proaterotrombóticas en la DMT2/SM	32
Tabla 3	Cebadores y condiciones de las reacciones de PCR para el genotipado de cada gen	64
Tabla 4	Reactivos empleados para la detección de colágeno según la tinción de Masson	71
Tabla 5	Anticuerpos primarios empleados en técnicas de inmunohistoquímica	74
Tabla 6	Anticuerpos secundarios y reactivos químicos empleados en técnicas de inmunohistoquímica.	74
Tabla 7	Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante Western Blot.	83
Tabla 8	Anticuerpos secundarios y reactivos empleados para la detección de proteínas mediante Western Blot.	83
Tabla 9	Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica mediante qPCR	85
Tabla 10	Criterios diagnósticos para el SM de los pacientes incluidos en el estudio	86
Tabla 11	Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica por qPCR en CMSPs de pacientes	88
Tabla 12	Parámetros bioquímicos y antropométricos de los pacientes con SM sensibles (SM-SI) y resistentes a insulina (SM-RI)	95
Tabla 13	Listado de los 84 genes analizados en el <i>Insulin Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array System</i>	110

INTRODUCCIÓN

1. ATEROSCLEROSIS

1.1. Incidencia de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de mortalidad en el mundo (W. van Lammeren et al., 2011). La ECV, considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad no transmisible, provoca un 38% del total de defunciones en el mundo (*Fuente: Organización Mundial de la Salud-ENT Perfiles de países, 2011*). Según la OMS, se calcula que en 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas por ECV. Además, cinco de las diez principales amenazas mundiales para la salud están relacionadas con factores de riesgo de la ECV, como hipertensión arterial, tabaquismo, consumo de alcohol, hipercolesterolemia, diabetes y obesidad o sobrepeso. En España, según las estadísticas provisionales del 2006, las ECV ocasionaron 120.760 defunciones siendo la principal causa de muerte en las mujeres (36,8% del total) y la segunda en los varones (28,6%) después del cáncer. Por otro lado, la incidencia de la ECV aumenta también con la edad, siendo más frecuente a partir de los 75 años. Las formas agudas de ECV que provocan un mayor número de muertes son el infarto de miocardio y el ictus cerebral. Ambas constituyen el 57,9% de la mortalidad cardiovascular total, siendo del 30,7% por enfermedad coronaria (38,2% en varones y 24,3% en mujeres), y del 27,2% por ictus (29,2% en mujeres y 25% en varones) (Bertomeu and Castillo-Castillo, 2008). En la inmensa mayoría de los casos, tanto el infarto de miocardio como el ictus son una complicación aguda de un proceso de aterosclerosis en la pared arterial.

1.2. Estructura de la pared arterial

La pared arterial está compuesta por tres capas: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia (**Figura 1**). **La túnica íntima**, constituida por una monocapa de células endoteliales y tejido conectivo, regula la permeabilidad de la pared vascular a elementos celulares y macromoléculas. Presenta una superficie a través de la cual se produce el intercambio de nutrientes y de oxígeno entre la sangre y los tejidos circundantes. El endotelio es capaz de modificar su estado funcional para contribuir a mantener la homeostasis de la pared vascular (Michiels, 2003). **La túnica media** está formada por células de músculo liso vascular (cMLVs) que producen gran parte de los

componentes mayoritarios de la matriz extracelular, como elastina, colágeno y proteoglicanos. Esta capa determina la elasticidad y la contractilidad de la pared arterial. La capa más externa a la luz del vaso es la **adventicia** y está compuesta por una red de tejido conectivo, incluyendo fibras de colágeno, fibras elásticas, fibroblastos, cMLVs y terminaciones nerviosas.

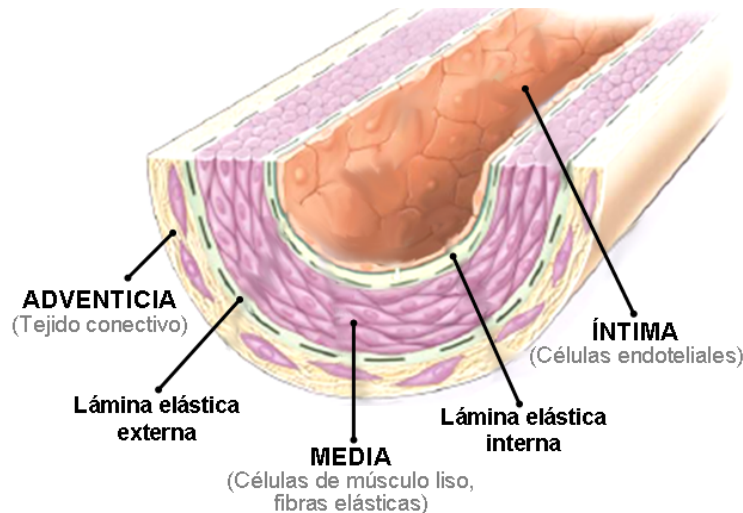


Figura 1. Estructura de la pared arterial. La capa más externa a la luz del vaso es la capa adventicia y está formada por una red de fibras de colágeno, fibras elásticas, fibroblastos y cMLVs. La capa en contacto con la luz del vaso se denomina túnica íntima y la constituye una monocapa de células endoteliales que, junto con tejido conectivo, constituye una barrera selectiva permeable entre la sangre y los tejidos. Entre la capa adventicia y la túnica íntima se encuentra la túnica media formada principalmente por cMLVs. La capa de cMLVs está delimitada además por la lámina elástica externa y la lámina elástica interna. (Adaptado de Ross, 1999).

1.3. Alteraciones de la homeostasis de la pared vascular: la aterosclerosis

Una de las alteraciones fisiopatológicas del lecho vascular más frecuente es la aterosclerosis, un proceso patológico natural que se desarrolla en las arterias de gran calibre y en las arterias coronarias durante el envejecimiento humano. La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial que provoca la acumulación progresiva de material lipídico y celular en el subendotelio vascular produciendo un estrechamiento de la luz del vaso, pérdida de la elasticidad de la pared arterial y deterioro de la función vascular. Los primeros eventos en la aterogénesis incluyen la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL, *del inglés, Low Density Lipoproteins*) en el espacio subendotelial, la interacción de monocitos circulantes con las células endoteliales activadas, la migración de éstos al espacio subendotelial y su diferenciación en el subendotelio. Por otro lado, la enfermedad es considerada un

proceso inflamatorio crónico en el que las células del sistema inmune, principalmente macrófagos y linfocitos T, regulan la respuesta perpetuando el proceso e iniciando la formación de lesiones ateromatosas más complejas (Libby et al., 2010). En fases avanzadas, las lesiones pueden ocluir la luz de los vasos directamente aunque los eventos agudos (infarto de miocardio, ictus, embolia) se desencadenan como resultado de la erosión y rotura de las placas y la formación de trombos asociados a la rotura (Fuster et al., 1992; Libby et al., 2011; Navab et al., 1995; Ross and Fuster, 1996).

1.4. Inicio y evolución de la aterosclerosis

El proceso de la aterosclerosis ocurre principalmente en tres etapas: formación de la estría grasa, formación de lesiones complejas con placa fibrosa y generación de placas vulnerables o inestables (Glass and Witztum, 2001; Lusis, 2000).

Las lesiones ateroscleróticas comienzan en forma de estrías grasas como consecuencia de la disfunción y activación de las células endoteliales causada por ciertos factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia o tabaquismo), los cuales producen un aumento de la permeabilidad del endotelio vascular facilitando la penetración y retención de las LDL en el subendotelio vascular. Las células endoteliales activadas aumentan la expresión de moléculas de adhesión, como VCAM-1 (*del inglés, Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), ICAM-1 (*del inglés, Intercellular Adhesion Molecule-1*) y P-selectina (Moore and Tabas, 2011), favoreciendo la adhesión y migración de monocitos al espacio subendotelial. Por acción del factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF, *del inglés, Macrophage Colony Stimulation Factor*), los monocitos proliferan y se diferencian a macrófagos. Las LDL retenidas en el subendotelio experimentan modificaciones, como la oxidación (LDLox), generan productos que inducen la actividad quimiotáctica de monocitos y aumentan la expresión de citoquinas proinflamatorias, como MCP-1 (*del inglés, Monocyte Chemotactic Protein-1*) (Navab et al., 1991). Estas alteraciones perpetúan el proceso de reclutamiento de monocitos. Además, las LDLox provocan apoptosis de las células endoteliales (Sata and Walsh, 1998) y alteran la producción de óxido nítrico (NO) y de radicales libres (Liao et al., 1995) con el consiguiente deterioro de la función normal del endotelio. Por otro lado, los macrófagos activados captan las LDLox mediante los receptores *scavenger*, entre

otros, Sra y CD36, transformándose en células espumosas que se depositan formando la estría grasa y constituyen el principal componente celular en la fase inicial de la aterosclerosis (Ross, 1999) (**Figura 2**).

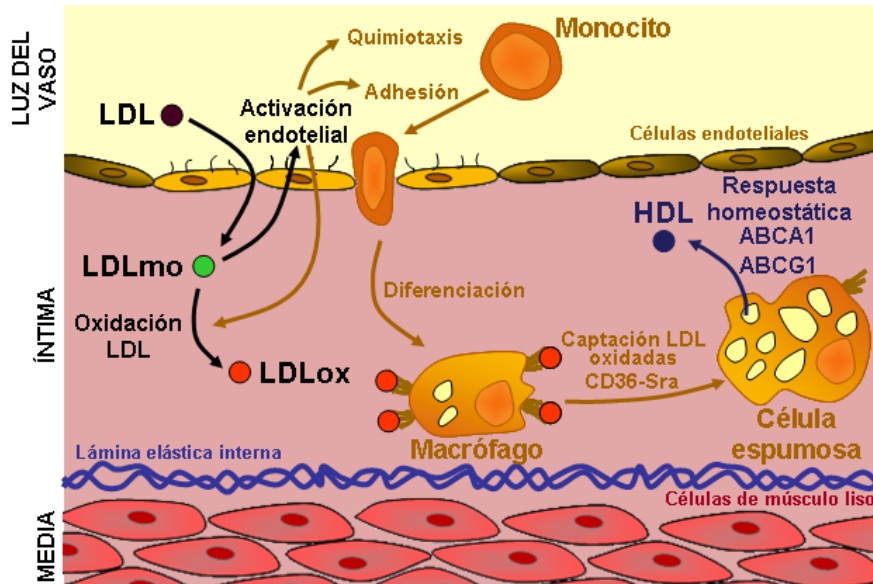


Figura 2. Procesos aterogénicos que inician la formación de la estría grasa. Las LDL retenidas en el espacio subendotelial experimentan procesos de modificación y oxidación e inducen la producción de agentes con actividad quimiotáctica para monocitos. Estos monocitos se adhieren al endotelio y migran al espacio subendotelial en donde se diferencian a macrófagos. Los macrófagos captan LDLmo y LDLox mediante sus receptores *scavenger*, SRA y CD36 entre otros, y se transforman en células espumosas cuya acumulación en el espacio subendotelial origina la formación de la estría grasa (LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLmo, LDL modificadas; LDLox, LDL oxidadas) (Modificado de Glass y Witztum, 2001).

En esta etapa inicial la participación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *del inglés, High Density Lipoproteins*) juega un papel fundamental disminuyendo la acumulación de colesterol en los macrófagos. Así, las HDL participan en el transporte reverso de colesterol desde las células espumosas, un proceso mediado por las proteínas de membrana ABCA1 y ABCG1 (*del inglés, ATP-Binding Cassette transporter A1 y G1, respectivamente*) que constituye un mecanismo compensatorio para inhibir el desarrollo de la lesión aterosclerótica (Moore and Tabas, 2011; Wang et al., 2007). Además, las HDL previenen la oxidación lipídica debido, en parte, a la presencia de la paraoxonasa sérica, que es capaz de hidrolizar los fosfolípidos oxidados presentes en las LDLox (Barter et al., 2004). Por otra parte, las HDL inhiben la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales disminuyendo la adhesión de monocitos y su subsiguiente migración a la pared arterial (Barter et al., 2002).

En estadios más avanzados en los que los procesos de disfunción endotelial, oxidación de LDL y acumulación crónica de células espumosas se encuentran aumentados, los mecanismos compensatorios llevados a cabo por las HDL resultan ineficaces y la lesión aterosclerótica se agrava. La activación de linfocitos T induce en macrófagos la secreción de citoquinas, como Interferón- γ (IFN- γ) y factores de necrosis tumoral TNF- α y TNF- β (*del inglés, Tumor Necrosis Factor*), amplificando la respuesta inflamatoria y estimulando la proliferación de macrófagos (Ross, 1993). La secreción de citoquinas y la liberación de factores de crecimiento por macrófagos y células T activan también a las cMLVs, las cuales cambian desde un fenotipo contráctil no proliferativo, típico de arterias sanas, a un fenotipo más proliferativo y migratorio (Lusis, 2000). Esta activación provoca que las cMLVs atraviesen la túnica media y la lámina elástica interna y se acumulen en la íntima/lesión ateromatosa. Las cMLVs de la íntima contribuyen a la síntesis de matriz extracelular debido a la secreción de colágeno, fibronectina y proteoglicanos y captan lipoproteínas modificadas, contribuyendo, junto con las células espumosas derivadas de macrófagos, al engrosamiento del núcleo lipídico (Owens et al., 2004; Ross, 1993). La acumulación de las cMLVs en la parte más cercana al lumen vascular junto con la matriz extracelular constituyen la cubierta fibrosa (Glass and Witztum, 2001) (**Figura 3**). La respuesta proliferativa de las cMLVs y de las células inflamatorias hace que la placa fibrosa evolucione a una lesión aterosclerótica más compleja.

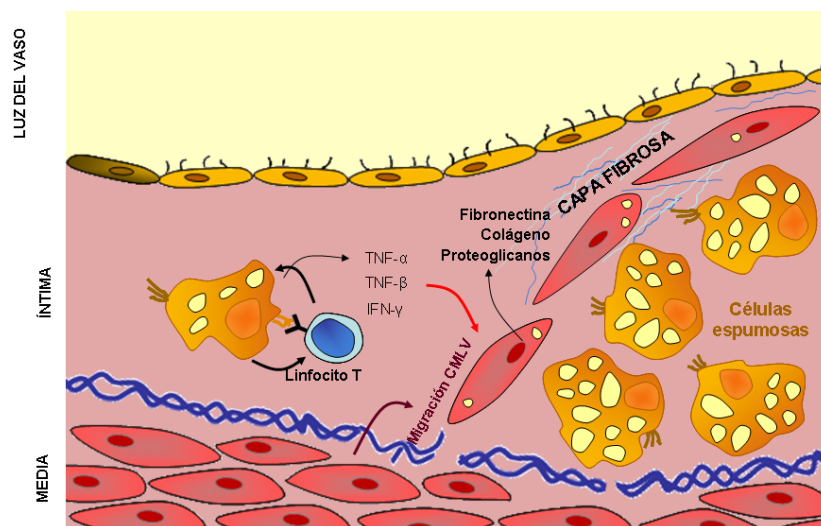


Figura 3. Progresión de la lesión y formación de la capa fibrosa. La progresiva acumulación de células espumosas aumenta el tamaño de la lesión contribuyendo al engrosamiento del núcleo lipídico. Los agentes quimiotácticos liberados por estas células promueven la migración de las cMLVs desde la media hacia la matriz subendotelial donde proliferan y captan lipoproteínas modificadas. Las cMLVs y los componentes de la matriz extracelular que secretan forman la cubierta fibrosa (Modificado de Glass y Witztum, 2001).

1.5. Vulnerabilidad y estabilidad de la placa

En general, la enfermedad aterosclerótica es asintomática hasta que se producen eventos trombóticos debido a cambios en la placa de ateroma, como son la muerte celular, procesos de calcificación y degradación de la matriz extracelular que conducen a la erosión y rotura de la lesión. Inicialmente las placas de ateroma no disminuyen el lumen vascular debido a que se produce un remodelado positivo compensatorio de la pared vascular (Bornfeldt and Tabas, 2011). La placa crece de forma excéntrica y se produce el adelgazamiento de la media y la adventicia hasta que el remodelado positivo ya no puede proseguir, momento en el cual la lesión ateromatosa empieza a crecer hacia el interior de la luz del vaso y el flujo sanguíneo disminuye.

Las placas estables se caracterizan por la presencia de un núcleo lipídico y una gruesa cubierta fibrosa con un alto contenido de cMLVs y de matriz extracelular y escasez de macrófagos. Por el contrario, las placas vulnerables o inestables se caracterizan por poseer un núcleo lipídico importante, en muchas ocasiones con núcleos necróticos, y una delgada cubierta fibrosa pobre en colágeno y cMLVs. La “American Heart Association” clasifica las placas de ateroma humano en seis tipos, de las cuales las placas Tipo IV, caracterizadas por la existencia de un núcleo necrótico lipídico, y las Tipo V, calcificadas, son las consideradas como más vulnerables. Las placas Tipo VI son las que desencadenan el evento trombótico (**Figura 4**). Según esta clasificación, las placas consideradas como no vulnerables son las de Tipo I, que se manifiestan como lesiones iniciales con presencia de macrófagos y células espumosas de manera aislada, las de Tipo II, que presentan la suficiente cantidad de lípidos como para provocar la formación de la estría grasa, y las placas de Tipo III con presencia de lípidos extracelulares (Stary et al., 1995).



Figura 4. Vulnerabilidad de la placa. La placa estable es resistente a la rotura por poseer una gruesa cubierta fibrosa y pocos elementos inflamatorios. Por el contrario, la placa inestable o vulnerable posee una cubierta fibrosa delgada y elementos inflamatorios que facilitan su erosión y rotura (W. van Lammeren et al., 2011).

Los principales mecanismos que contribuyen a la generación de placas inestables son la apoptosis de los macrófagos y la degradación de la matriz extracelular.

La apoptosis de macrófagos favorece la liberación de lípidos a la matriz extracelular que, junto con una deficiente fagocitosis de los mismos por otros macrófagos, proceso denominado eferocitosis, conduce a la formación del núcleo necrótico característico de placas avanzadas vulnerables. Esta combinación es fundamental en el avance de la lesión, puesto que la muerte de macrófagos también ocurre en lesiones tempranas. Sin embargo, en los estadios iniciales de la aterosclerosis, la eferocitosis es eficiente, lo que lleva a una disminución de la celularidad de la lesión y de la inflamación, evitando así la progresión y necrosis de la placa (Moore and Tabas, 2011). Entre los mecanismos que inducen apoptosis en macrófagos se encuentra la inducción por estrés del retículo endoplasmático que favorece la acumulación de LDLox y de ácidos grasos saturados (Tabas, 2009) **(Figura 5)**. Además, la apoptosis excesiva de macrófagos provoca una disminución en la secreción de TGF- β , lo cual reduce la síntesis de colágeno por las cMLVs (Fadok et al., 1998), el contenido en colágeno de la placa y, por lo tanto, su estabilidad.

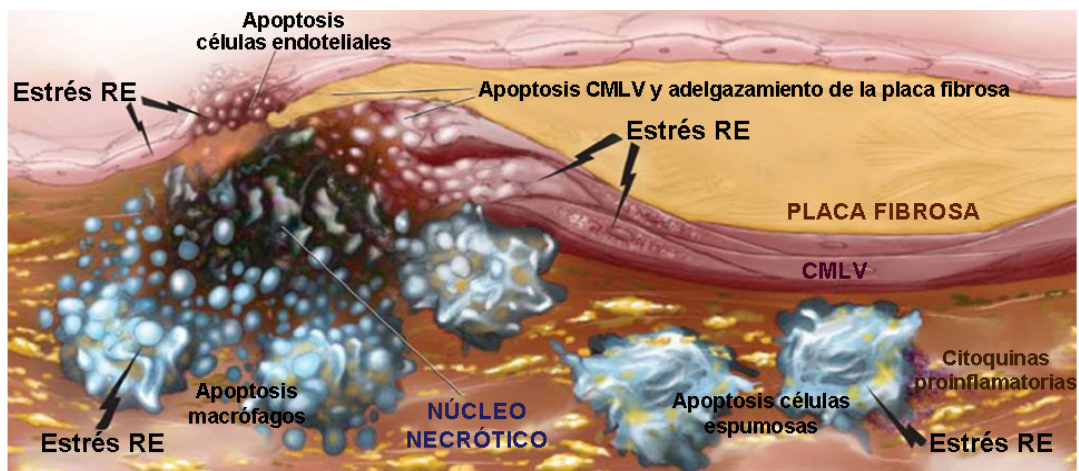


Figura 5. Posible papel del estrés del retículo endoplasmático en la progresión de la lesión aterosclerótica. En lesiones avanzadas, el estrés del retículo endoplasmático (estrés RE) en macrófagos puede conducir a su muerte por apoptosis. Cuando los macrófagos apoptóticos no son eficazmente eliminados conducen a la formación del núcleo necrótico lipídico. Además, el estrés RE puede contribuir a la apoptosis tanto de células endoteliales como de cMLVs lo que contribuye al adelgazamiento de la placa fibrosa aumentando la vulnerabilidad (*Adaptado de Tabas, 2011*).

Otro mecanismo que contribuye a la vulnerabilidad y la ruptura de la placa es la apoptosis de las cMLVs, proceso generalmente inducido por la muerte celular de macrófagos cercanos (Moore and Tabas, 2011). Por ejemplo, la secreción de NO y TNF- α por macrófagos puede desencadenar la apoptosis de las cMLVs (Boyle et al., 2003), lo que conlleva una menor capacidad para sintetizar los componentes de la matriz celular y una disminución del grosor de la cubierta fibrosa. Por otro lado, la secreción de IFN- γ por los linfocitos T en estadios avanzados inhibe la producción de colágeno por parte de las cMLVs, acelerando el adelgazamiento de la cubierta fibrosa (Libby et al., 2010). Así, las cMLVs son esenciales para la estabilidad de la placa ya que el mantenimiento de la matriz extracelular de la placa fibrosa depende del equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas de la matriz. Además, las proteínas de la matriz son degradadas por una familia de proteasas denominadas metaloproteinasas de matriz (MMP, *del inglés, Matrix Metalloproteinase*) que pueden ser secretadas por todas las células presentes en la pared arterial, incluidas las cMLVs, aunque la producción de las mismas por parte de los macrófagos juega un papel predominante. Los macrófagos producen MMP como colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13), estromelisin (MMP-3, MMP-10, MMP-11), metaloelastasas (MMP-12) matrilisinas (MMP-7, MMP-26), metaloproteinasas de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17) y gelatinasas (MMP2 y MMP-9) que desestructuran la matriz extracelular por degradación del colágeno y promueven el adelgazamiento y desestabilización de la cubierta fibrosa aumentando su vulnerabilidad (Newby, 2008).

Otros procesos que generan placas más vulnerables en lesiones avanzadas son la neovascularización y la calcificación asociada (Fuster et al., 2005). La neovascularización es un proceso por el cual los *vasa vasorum*, capilares típicos de la capa adventicia, nutren la placa aterosclerótica al proporcionar una comunicación permanente entre la circulación sistémica y el ateroma. Dichos capilares invaden la capa íntima y aportan mediadores de inflamación, factores de crecimiento y sales minerales que hacen posible la mineralización (Demer and Tintut, 2003; Virmani et al., 2000). Los *vasa vasorum* pueden experimentar procesos de hemorragia intraplaca y ser fuente de eritrocitos que, al lisarse, liberan colesterol y fosfolípidos desestabilizando el núcleo necrótico. El cambio producido por la acumulación excesiva de eritrocitos puede promover la transición de una lesión estable a una inestable (Virmani et al., 2005).

La mayoría de episodios que producen rotura de placa no causan síntomas clínicos agudos debido, presumiblemente, a que la placa expuesta es poco trombogénica en comparación con las placas que producen los síntomas coronarios agudos (Fuster et al., 1992). Algunos de los factores responsables del incremento de potencial trombogénico de la placa después de su rotura son su contenido de factor tisular y el número de células espumosas derivadas de macrófagos que liberan esta glicoproteína que inicia la cascada de coagulación y provoca la adhesión de plaquetas circulantes a la pared vascular (Glass and Witztum, 2001; Libby et al., 2010; Toschi et al., 1997) (**Figura 6**).

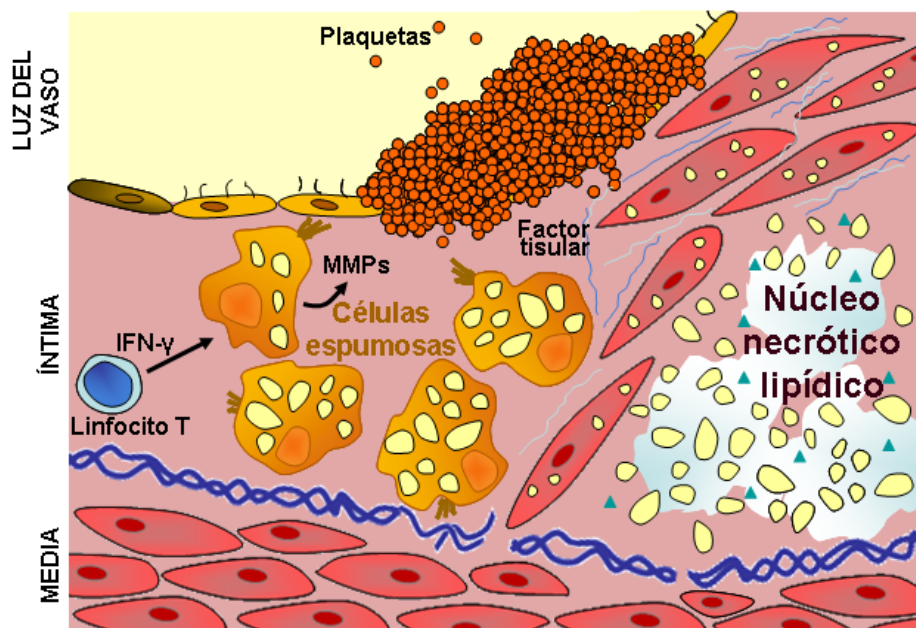


Figura 6. Ruptura de la placa y trombosis. La apoptosis de macrófagos y de cMLVs conduce a la formación del núcleo necrótico lipídico y a la acumulación de colesterol extracelular. La secreción de MMPs y la neovascularización contribuyen a la inestabilidad de la cubierta fibrosa. La ruptura de la placa expone los componentes de la sangre al factor tisular iniciando los procesos de coagulación, con reclutamiento de plaquetas y formación de un trombo (Modificado de Glass y Witztum, 2001).

2. FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR (ECV): DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2) Y SÍNDROME METABÓLICO (SM)

2.1. Generalidades y definición de DMT2 y SM

Un factor de riesgo se define como una característica relacionada causalmente con el aumento de frecuencia de una determinada enfermedad por lo que constituye un factor predictivo, aunque independiente, del riesgo de contraer dicha enfermedad.

La epidemiología cardiovascular comenzó en los años 30 del siglo XX. En 1948, el Servicio de Salud Pública (NHLBI, *del inglés, National Heart, Lung, and Blood Institute*) de Estados Unidos inició el estudio Framingham con el fin de identificar los factores de riesgo de ECV. El estudio, todavía en curso, ha identificado hasta la fecha una serie de factores genéticos y ambientales como condicionantes en el desarrollo de la ECV, entre los que se encuentran concentraciones elevadas de lípidos en sangre (en particular colesterol y triglicéridos), desarrollo de resistencia a insulina (RI), DMT2, hipertensión, obesidad e hiperglucemia (Grundy et al., 2005). Según los criterios propuestos en el año 2001 por el “*National Cholesterol Education (NCEP) Program Adult Treatment Panel III (ATP III)*” el SM se define por la presencia de al menos tres de las siguientes alteraciones: obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, bajos niveles de colesterol HDL, hipertensión y valores alterados de glucosa en ayunas (Alberti et al., 2009; Ginsberg et al., 2006) (**Tabla 1**). Estas alteraciones combinadas conducen al desarrollo de RI que es la antesala de la DMT2 (Alberti et al., 2009; Grundy et al., 2005) y se cree que es el nexo de unión entre SM/DMT2 y el desarrollo de ECV (Biddinger and Kahn, 2006).

Tabla 1. Criterios diagnósticos de SM propuestos por el “Program Adult Treatment Panel III (ATP III)” (Grundy et al, 2005)

Circunferencia de la cintura (cm)	≥102 en hombres ≥88 en mujeres
Triglicéridos	≥150 mg/dL (1,7 mmol/L)
Colesterol HDL	<40 mg/dL (1,03 mmol/L) en hombres <50 mg/dL (1,3 mmol/L) en mujeres
Presión arterial	Presión arterial sistólica ≥130 mmHg Presión arterial diastólica ≥85 mmHg
Glucosa en ayunas	≥100-110 mg/dL

La DMT2 y el SM son dos de los factores de riesgo más importantes con un alto impacto socio-sanitario ya que aumentan el riesgo de desarrollar aterosclerosis y ECV de 2 a 10 veces. Según datos de la OMS se estima que la población afectada por DMT2 en el año 2030 alcanzará los 366 millones (Wild et al., 2004) debido, principalmente, al envejecimiento de la población y a la adquisición de estilos de vida sedentarios que conllevan una disminución de la actividad física y un aumento de la obesidad (Alberti et al., 2009; Hossain et al., 2007; Nunn et al., 2009). En España, también según la OMS, se estima que la prevalencia de la DMT2 aumente en un 40% en el año 2025, en comparación con el año 2000 (Conget, 2002).

La prevalencia del SM aumenta con la edad y con el sobrepeso, situándose alrededor del 24% en la población general y cerca del 50% en los pacientes con alguna alteración cardiovascular. Por ello es de gran relevancia investigar los mecanismos implicados en el desarrollo de la ECV asociada a estas enfermedades metabólicas. De hecho, la presencia de RI por sí sola aumenta el riesgo de ECV (Pirro et al., 2002) y se manifiesta como una asociación de síntomas que comprenden la intolerancia a la glucosa, dislipidemia, obesidad e hipertensión que favorecen la aparición de la DMT2 y de la ECV (**Figura 7**).



Figura 7. RI y su relación con la ECV y la DMT2. La RI juega un papel pivote en el desarrollo de algunas alteraciones metabólicas características del SM (en naranja). Estas alteraciones metabólicas promueven el desarrollo de distintas patologías (en rojo). (PCOS, síndrome de ovario poliquístico) (*Adaptado de Biddinger, 2006*).

La RI se define como una pérdida de la sensibilidad a esta hormona causada por una reducida señalización en sus tejidos diana periféricos, como músculo o tejido adiposo, que alteran el metabolismo glucídico (Biddinger and Kahn, 2006). La falta de sensibilidad a insulina en el hígado aumenta la producción endógena de glucosa favoreciendo el desequilibrio glucémico. Inicialmente, las células β -pancreáticas compensan la pérdida de sensibilidad e incrementan la secreción de insulina para mantener los niveles normales de glucosa produciendo un estado de hiperinsulinemia. Sin embargo, la continua estimulación de la secreción de insulina conduce a la hipertrofia de las células β -pancreáticas, que acaban deteriorándose. La consecuente disminución en la producción de insulina provoca elevación en la concentración de glucosa. Esto acaba produciendo glucotoxicidad y daño en las células β -pancreáticas, lo que conduce a su muerte y al establecimiento de la hiperglucemia característica de la DMT2 (Grundy et al., 2005; Semenkovich, 2006) (**Figura 8**). En condiciones normales la apoptosis es mínima y compensa procesos de reorganización de las células β -pancreáticas manteniéndose el equilibrio entre apoptosis y regeneración. Sin embargo, en estados de RI el balance se pierde y la apoptosis excede la regeneración de las células β -pancreáticas produciendo la disminución de la masa celular y acelerando la aparición de DMT2 (Butler et al., 2003; Rhodes, 2005).

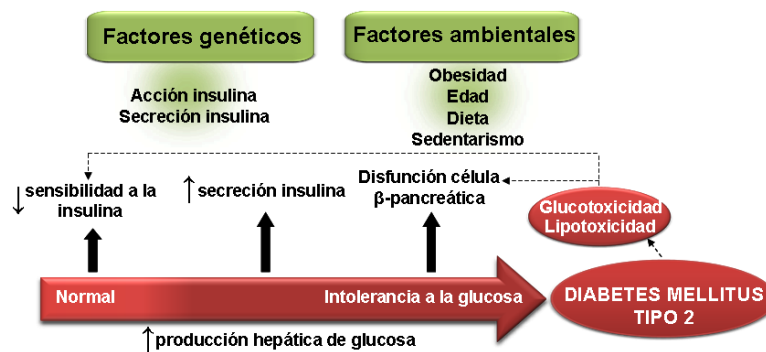


Figura 8. Patogénesis de la DMT2. Los estados condicionantes de la DMT2 tienen una base genética y ambiental que producen una pérdida de la sensibilidad a la insulina, y un aumento en la secreción de insulina como respuesta compensatoria. Finalmente, la disfunción de las células β -pancreáticas conduce a la hiperglucemia característica de la DMT2 (*Adaptado de Conget, 2002*).

Además, la pérdida de sensibilidad a insulina en el tejido adiposo induce la movilización de la grasa, aumentando en los adipocitos la lipólisis de los triglicéridos y favorece el flujo de ácidos grasos libres. Niveles elevados de ácidos grasos acaban produciendo lipotoxicidad en músculo y en hígado, afectando al transporte y captación de la glucosa, mientras que en células β -pancreáticas acaban impidiendo la secreción de insulina (Beckman et al., 2002; Lewis et al., 2002).

2.2. La dislipidemia diabética

La falta de una correcta señalización por insulina, especialmente en tejidos periféricos, resulta en un metabolismo lipídico proaterogénico (Semenkovich, 2006). Por ello, entre todos los factores atribuibles a la patología cardiovascular asociada a la DMT2, la dislipidemia diabética producida por la RI desempeña un papel central en el desarrollo de la arteriosclerosis (Ginsberg et al., 2006).

La dislipidemia diabética se caracteriza por una serie de alteraciones en el plasma, entre las que destacan una elevada concentración de triglicéridos, reducción en los valores de colesterol HDL (c-HDL), e incremento en las concentraciones de sdLDL (*del inglés, Small Dense LDL*) con facilidad para oxidarse, provocando la acumulación de células espumosas y el agravamiento de la lesión (Adiels et al., 2008; Neeli et al., 2009; Vijayaraghavan, 2010) (**Figura 9**). Estudios epidemiológicos y clínicos han establecido una clara relación entre niveles bajos de c-HDL y riesgo cardiovascular. El estudio Framingham demostró la magnitud de esta asociación estimando que el riesgo de sufrir ECV disminuye entre un 1% y un 2% por cada 1mg/dL de aumento en los niveles de c-HDL (Ginsberg and MacCallum, 2009).

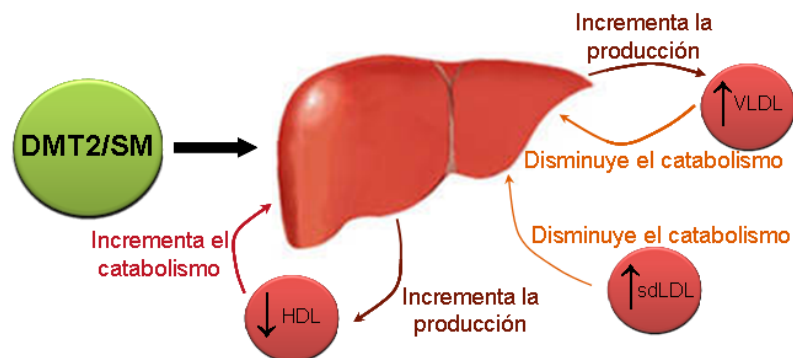


Figura 9. Cambios en el metabolismo lipídico en la DMT2 y en el SM. La RI en estados de DMT2/SM se asocia con un aumento en la producción de VLDL (*del inglés, Very Low Density Lipoprotein*), disminución en el catabolismo de las VLDL y sdLDL y una disminución en la concentración de las HDL al aumentar su catabolismo a pesar de que se produce un aumento compensatorio de su producción hepática. (*Adaptado de Adiels et al, 2008 y Vijayaraghavan, 2010*).

2.3. Efectos de la DMT2 y del SM en la ECV

Como se ha mencionado anteriormente numerosos estudios clínicos ponen de manifiesto una clara relación entre DMT2/SM y el riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares (Askari et al., 2002; Beckman et al., 2002; Gerstein and Yusuf, 1996; Stolar and Chilton, 2003). De entre las causas del aumento de riesgo de ECV en pacientes con DMT2/SM se han descrito numerosas alteraciones en diferentes tipos celulares. Así se han encontrado cambios en células endoteliales, en cMLVs y en plaquetas que aceleran el proceso aterosclerótico, aumentan la inestabilidad de la placa y favorecen la formación de trombos, aunque los mecanismos que subyacen no están totalmente esclarecidos (**Tabla 2**) (Askari et al., 2002; Beckman et al., 2002; Kanter et al., 2007; Moreno and Fuster, 2004; Semenkovich, 2006; Stolar and Chilton, 2003).

Tabla 2. Alteraciones proaterogénicas y proaterotrombóticas en la DMT2/SM

ALTERACIÓN	MECANISMO	EFECTOS
Incremento estrés oxidativo	Disminución en la producción de NO en el endotelio Incremento de la producción de ROS en células endoteliales y en cMLVs	Disfunción endotelial
Incremento en la inestabilidad de la placa	Disminución del contenido de colágeno en la íntima por incremento en la expresión o en la actividad de MMP Disminución de la síntesis de colágeno dependiente de las cMLVs por incremento de la producción de citoquinas por las células endoteliales Apoptosis de cMLVs mediada por LDLox	Vulnerabilidad de la placa
Incremento actividad trombogénica	Activación de plaquetas y alteración en la actividad fibrinolítica	Formación de trombos

La hiperglucemia sostenida en la DMT2/SM induce apoptosis y disminución en la proliferación de cMLVs y de células endoteliales (Averill and Bornfeldt, 2009; Bansilal et al., 2007). Además, la producción endotelial de NO bloquea la activación de eNOS (*del inglés, Endothelial Nitric Oxide Synthase*) e incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, *del inglés, Reactive Oxygen Species*) (Beckman et al., 2002; Steinberg et al., 1996). Estas alteraciones cambian las propiedades vasodilatadoras del endotelio y favorecen su disfunción. El aumento de los niveles de

ROS debido al estrés oxidativo provoca la activación de factores de transcripción, como NF- κ B (*del inglés, Nuclear Factor-KappaB*), que regulan la expresión de genes que codifican para mediadores de la aterogénesis, incluyendo moléculas de adhesión de leucocitos al endotelio, proteínas quimioatrayentes que reclutan leucocitos y monocitos a la pared vascular, y moléculas proinflamatorias presentes en la placa de ateroma, como TNF- α e interleucina-1 (IL-1) (Rosen et al., 2001; Schmidt and Stern, 2000). Las células endoteliales dañadas también incrementan la producción de citoquinas que provocan la disminución de la síntesis de colágeno por las cMLVs, disminuyendo así la estabilidad de la placa ateromatosa. Además, el TNF- α incrementa la producción de sustancias vasoconstrictoras, como endotelina-1 y angiotensina II, que inducen hipertrofia de las cMLVs (Maenhaut and Van de Voorde, 2011). Además, la hiperglucemia característica de la DMT2/SM favorece la trombogénesis mediante la activación plaquetaria reduciendo la producción de inhibidores plaquetarios. Así, los pacientes con DMT2/SM muestran un aumento en la coagulación de la sangre debido a la reducción en la actividad fibrinolítica, al aumento en los niveles de factores procoagulantes, como el factor tisular, y a la disminución en los niveles endógenos de factores anticoagulantes, como la antitrombina III y la proteína C, lo que aumenta el riesgo cardiovascular y favorece la formación de trombos y la ruptura de la placa (Beckman et al., 2002; Mackman, 2004) **(Figura 10)**.

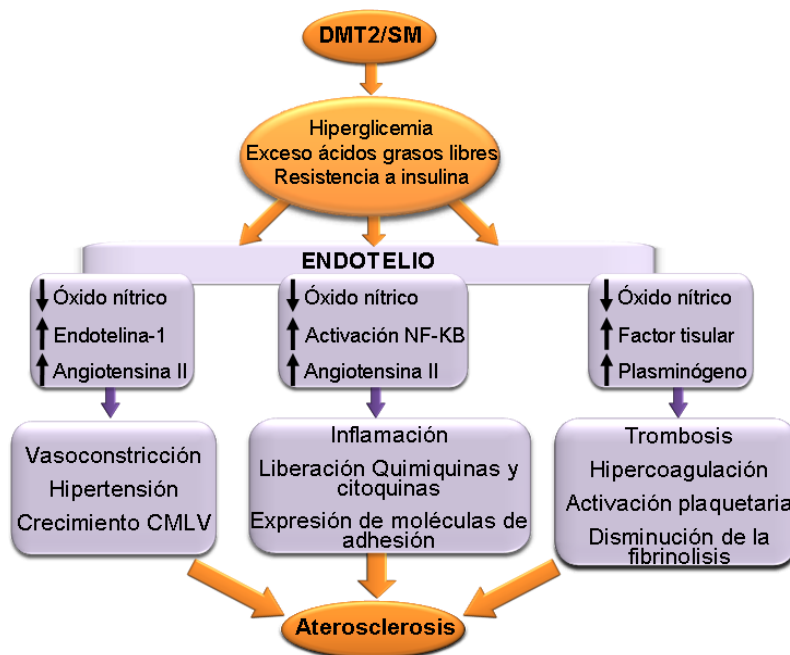


Figura 10. Disfunción endotelial en la DMT2/SM y desarrollo de aterosclerosis.

En la DMT2/SM los estados de hiperglucemia, el exceso de liberación de ácidos grasos libres y la RI deterioran la función endotelial aumentando la vasoconstricción, la inflamación y promoviendo la trombosis. La disminución en la producción de NO y el incremento de las concentraciones de endotelina-1 y angiotensina II provoca el aumento del tono vascular y el crecimiento y migración de las cMLVs. La activación entre otros del factor de transcripción NF-kB induce la liberación de quimiocinas atrayentes y citoquinas inflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión celular. El incremento en la producción del factor tisular crea un ambiente protrombótico que, junto con el descenso en la producción de NO y prostaciclina, favorece la activación plaquetaria (Adaptado de Beckman et al, 2002).

El estrés oxidativo provocado por el incremento de ROS aumenta el nivel de las LDLox, cuya acción proapoptótica provoca un descenso en el número de CMLVs en la cubierta fibrosa y menor síntesis de colágeno (Taguchi et al., 2000). Además, se produce un aumento de la producción de MMPs, favoreciendo la degradación del colágeno. De este modo, la combinación entre la disminución en la síntesis de colágeno y el aumento en su degradación y la disminución de cMLVs predispone a un mayor riesgo de ruptura de la placa y formación de trombos (Beckman et al., 2002) (Tabla 2).

3. PAPEL DEL SUSTRATO 2 DEL RECEPTOR DE LA INSULINA (IRS2) EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA

En estados de homeostasis la insulina regula el metabolismo y el crecimiento celular mediante la activación del receptor de la insulina (R-INS) situado en la membrana plasmática. El R-INS es una proteína heterotetramérica formada por dos subunidades α extracelulares unidas por puentes disulfuro que contienen el sitio de unión a la insulina, y dos subunidades β transmembrana que poseen actividad tirosina-quinasa en su dominio citoplasmático (White and Kahn, 1994). La unión de la insulina a la subunidad α induce la fosforilación de una de las subunidades β del receptor en residuos específicos de tirosina, produciéndose una rápida cascada de autofosforilación del propio receptor que permite a las subunidades β fosforilarse entre sí y fosforilar a las proteínas IRS (*del inglés, Insulin Receptor Substrate*) (Chang et al., 2004; Virkamaki et al., 1999) (**Figura 11**).

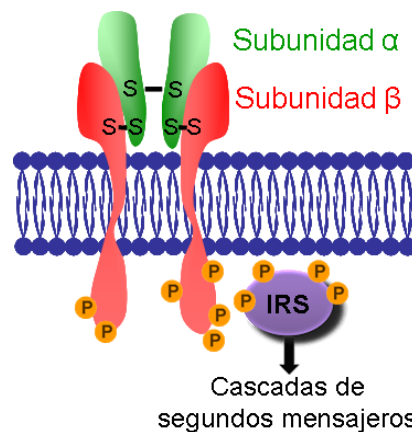


Figura 11. Estructura del R-INS. El R-INS se compone de dos unidades α , responsables del reconocimiento de la insulina, y de dos unidades β transmembrana. Tras la unión de la insulina, el R-INS se activa mediante fosforilación y transduce la señal mediante fosforilación a los efectores intracelulares IRS los cuales son reciclados continuamente y desencadenan las cascadas de señalización.

Los miembros de la familia IRS son proteínas con un peso molecular que varía entre 60 y 180KDa. Contienen un dominio PH (*del inglés, Pleckstrin Homology*), un dominio de unión tirosina (PTB, *del inglés, Protein Tyrosine-Binding*) y numerosos residuos de tirosina que, tras ser fosforilados, se unen a los dominios SH (*del inglés, Src Homology*) de proteínas efectoras, como la quinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K, *del inglés, Phosphatidylinositol 3-Kinase*) y Grb2 (*del inglés, Growth factor Receptor-Bound protein 2*). Éstas, a su vez, activan, respectivamente, las vías de señalización de la PI3K y de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK, *del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Biddinger and Kahn, 2006) (**Figura 12**). De este modo la

insulina regula el metabolismo energético, la expresión génica de sus genes diana y ejerce efectos mitogénicos (Avruch, 1998).

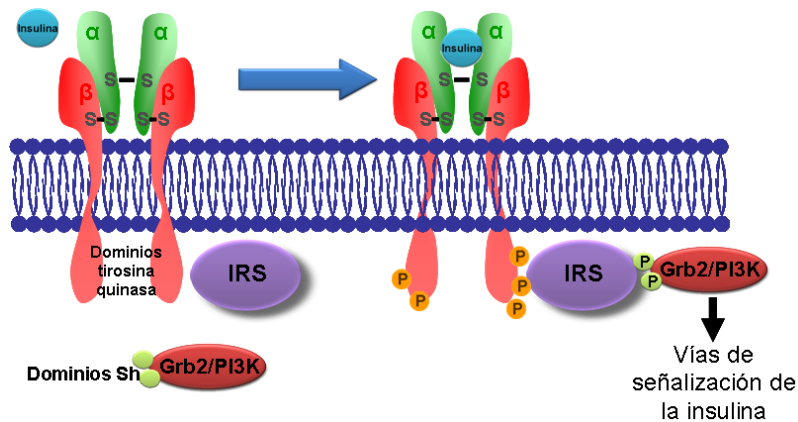


Figura 12. Activación de las vías de señalización de la insulina. Tras la unión de la insulina con su receptor y la fosforilación de las proteínas IRS, éstas se unen a dominios SH de proteínas efectoras que activarán las vías de señalización de PI3K y MAPK.

Existen distintas formas de IRS con funciones específicas. En el ratón se han caracterizado cuatro miembros: IRS1 (Sun et al., 1991), IRS2 (Sun et al., 1995), IRS3 (Lavan et al., 1997b) e IRS4 (Lavan et al., 1997a). En humanos sólo se han identificado los miembros IRS1, IRS2 e IRS4 (Bjornholm et al., 2002). IRS1, que se expresa de manera ubicua en diferentes tejidos, está implicado en el crecimiento somático celular (Araki et al., 1994) y parece ser el principal mediador de la señalización por insulina tanto en músculo esquelético como en tejido adiposo (Nandi et al., 2004). IRS2 se descubrió inicialmente como un componente de la señalización de interleucina-4 (Sun et al., 1997) pero en la actualidad se sabe que se expresa en casi todas las células y tejidos teniendo un papel importante en la acción de la insulina particularmente en el hígado y en la proliferación de las células β -pancreáticas. Por último, IRS3 se expresa predominantemente en el tejido adiposo mientras que IRS4 se expresa fundamentalmente en la glándula pituitaria, el timo y el cerebro (Fantin et al., 1999; Lavan et al., 1997b; Liu et al., 1999; Smith-Hall et al., 1997)

Si bien tanto IRS1 como IRS2 se expresan en células β -pancreáticas, IRS1 no parece estar implicado en el control de la masa celular. Por el contrario, IRS2 sí desempeña un importante papel en la regulación de las células β -pancreáticas (Rhodes, 2005). Efectivamente, el aumento en la expresión de IRS2 promueve la replicación de las células β -pancreáticas, la neogénesis y la supervivencia, mientras que la disminución en su expresión conduce a una deficiencia en la secreción de

insulina y a una reducción en la masa de las células β -pancreáticas debido a un aumento en la apoptosis (Kubota et al., 2000; Rhodes, 2005; Withers et al., 1998). De hecho, ratones deficientes para IRS2 desarrollan DMT2 y presentan RI, tanto en tejidos periféricos como en hígado, y disminución en la función de las células β -pancreáticas (Withers et al., 1998). A diferencia del fenotipo diabético grave de los ratones deficientes en IRS2, se ha demostrado que la inactivación de IRS1 en ratones solo produce una moderada RI en tejidos periféricos y defectos en la tolerancia a la glucosa, pero no provoca diabetes (Chang et al., 2004; Tamemoto et al., 1994). La RI en ratones deficientes en IRS1 va acompañada de una hiperplasia compensatoria de las células β -pancreáticas mediada por IRS2 (Kido et al., 2000; Withers et al., 1999; Withers et al., 1998). Además, la señalización por insulina es casi normal en el hígado de ratones *Irs1*^{-/-} cuya función es reemplazada presumiblemente por IRS2. Sin embargo, el crecimiento pre y post-natal de los ratones *Irs1*^{-/-} está fuertemente reducido (Araki et al., 1994; Withers et al., 1998). Estos resultados en modelos murinos indican que la señalización por insulina a través de IRS2 es necesaria para la diferenciación, crecimiento y/o supervivencia de las células β -pancreáticas, el IRS1 es un mediador del crecimiento somático, mientras que ambas proteínas están implicadas en la RI periférica.

Por otro lado, ratones deficientes para el R-INS nacen con un ligero retraso en el crecimiento y se produce entonces un incremento progresivo en los niveles de glucosa y un aumento transitorio de los niveles de insulina. A los pocos días del nacimiento se produce el daño en las células β -pancreáticas y muerte por cetoacidosis diabética. Este fenotipo indica que el R-INS es necesario para la supervivencia pero no para el control metabólico y el crecimiento prenatal (Nandi et al., 2004). De este modo, alteraciones en los IRS o en el R-INS producen características de RI y DMT2 (Biddinger and Kahn, 2006).

3.1. Vía de señalización PI3K

La señalización de la insulina a través de la vía de PI3K juega un papel esencial en la captación de glucosa y es el principal mediador de los efectos de la insulina sobre la síntesis lipídica, la síntesis de proteínas y el metabolismo glucémico.

PI3K es un heterodímero compuesto por una subunidad reguladora, p85, con ocho isoformas conocidas, y una subunidad catalítica, p110, de la que se conocen tres isoformas (Biddinger and Kahn, 2006). Tras la fosforilación de los residuos de tirosina inducidos por la unión de la insulina al R-INS, IRS fosforila la subunidad reguladora p85 de PI3K, promoviendo su cambio conformacional y la unión de la subunidad catalítica p110, con la consiguiente activación de PI3K (Chang et al., 2004). Esto provoca la fosforilación de fosfolípidos de membrana, siendo uno de los principales productos el fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃), el cual regula la localización subcelular y la actividad de numerosas proteínas. El incremento de PIP₃ estimulado por insulina induce el reclutamiento y activación de proteínas que contienen dominios PH, como la serina-treonina quinasa PDK1 (*del inglés, Phosphatidylinositol Dependent Kinase 1*). PDK1 activado fosforila y activa serina-treonina quinasas adicionales siendo las más relevantes las tres isoformas de Akt (*del inglés, V-akt murine thymoma viral oncogene homolog kinase*) (Nandi et al., 2004). Se ha demostrado que mientras niveles reducidos de Akt1 y Akt3 no afectan a la sensibilidad a insulina, la disminución de Akt2 produce una pérdida de sensibilidad a la insulina y una reducción en la disposición de glucosa (Cho et al., 2001). De hecho, ratones deficientes para Akt2 exhiben RI e intolerancia a la glucosa debido a una disminución en la captación de glucosa en músculo esquelético y a un incremento en la producción hepática de glucosa (Asano et al., 2007; Cho et al., 2001; Nigro et al., 2006). Tras su fosforilación, Akt promueve la translocación de los transportadores de glucosa GLUT (*del inglés, Glucose Transporter*) desde el interior de la célula a la membrana plasmática y la consiguiente entrada de glucosa al interior celular (**Figura 13**). GLUT presenta distintas isoformas que se expresan en distintos tejidos. En músculo esquelético y en adipocitos la insulina induce la translocación de GLUT4 (Lin et al., 2011; Thorens and Mueckler, 2009), mientras que GLUT2 se expresa en hígado y en células β -pancreáticas de ratón. De hecho, ratones deficientes para GLUT2 exhiben hiperglucemia acompañada por una elevación de ácidos grasos circulantes y mueren a las tres semanas de vida (Remedi and Nichols, 2009).

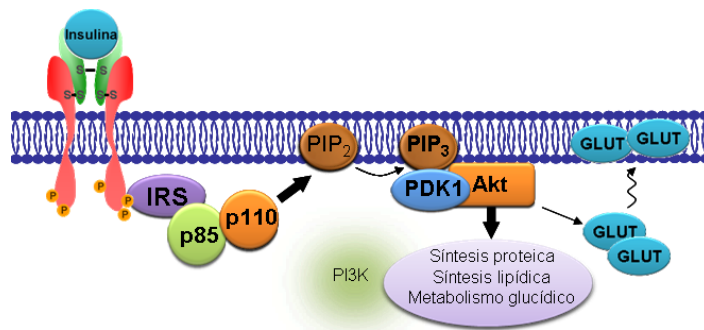


Figura 13. Activación de la vía PI3K por acción de la insulina. Las proteínas IRS fosforiladas interaccionan con y fosforilan (activan) la subunidad reguladora p85 de la PI3K, que a su vez se une a y activa a su subunidad catalítica p110. Una vez activada, PI3K fosforila fosfolípidos de membrana que sirven como ligandos de Akt en la cara interna de la membrana. Estos fosfolípidos (principalmente PIP₃) activan a PDK1, que fosforila y activa a Akt, un regulador clave de síntesis lipídica y proteica y del metabolismo glucídico. Además se produce la translocación de los transportadores de glucosa GLUT desde el interior de la célula a la membrana plasmática provocando la entrada de glucosa al interior celular.

3.2. Vía de señalización de las MAPK

La vía de señalización de las MAPK regula principalmente los efectos mitogénicos de la insulina (Biddinger and Kahn, 2006). Tras la unión a su receptor la insulina estimula la fosforilación de las proteínas Shc y de los residuos de tirosina de IRS, permitiendo la unión de ambos al factor de crecimiento Grb2, el cual se activa y recluta al factor Sos (*del inglés, Son Of Sevenless*) formando complejos Grb2-Sos. Los complejos Grb2-Sos activan a la proteína Ras y estimulan su unión a GTP, liberando GDP (Kim et al., 1998) y produciendo la activación secuencial de las quinasas Raf, MEK y ERK1/2 y, finalmente, desencadenando la cascada de señalización que conduce al crecimiento, diferenciación y proliferación celular (Nigro et al., 2006) (Figura 14).

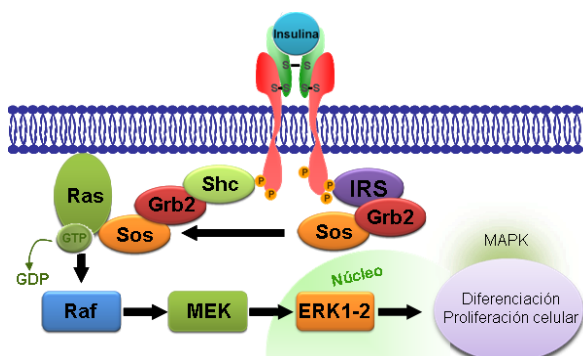


Figura 14. Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina. La acción de la insulina sobre las MAPK está mediada por las proteínas IRS y Shc, las cuales se unen a Grb2. Grb2 recluta a Sos y este complejo activa a Ras, induciendo la unión a GTP y la activación secuencial de las quinasas Raf, MEK y ERK1/2 que promueven la diferenciación y proliferación celular.

4. MODELOS MURINOS DE ATEROSCLEROSIS, DMT2/SM Y ATEROSCLEROSIS ACELERADA POR DMT2/SM

4.1. El ratón deficiente en apolipoproteína E como modelo de hipercolesterolemia y aterosclerosis

La apolipoproteína E (apoE) es un potente modulador de los niveles de colesterol y lipoproteínas plasmáticas debido a su capacidad de interacción con miembros de la familia del receptor de las LDL. La apoE es una proteína plasmática con un peso molecular aproximado de 34 KDa constituyente de todas las lipoproteínas excepto de las LDL (Meir and Leitersdorf, 2004). Como ligando del receptor de las LDL, participa en el transporte y captación de colesterol. Está presente tanto en ratones como en humanos y se expresa en un amplio conjunto de tejidos, como hígado, cerebro, bazo, pulmón, glándula adrenal, ovario, riñón, músculo (Mahley, 1988) y macrófagos (Lammers et al., 2011).

El ratón deficiente en la apoE (*apoE*^{-/-}) es un modelo experimental de hipercolesterolemia y aterosclerosis generado simultáneamente por dos laboratorios independientes mediante recombinación homóloga, de modo que el gen de apoE se reemplazó en parte con el gen de la resistencia a neomicina produciendo su interrupción (Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992). Los ratones *apoE*^{-/-} son sanos, viables, fértiles y de peso similar a los silvestres (*WT*, *del inglés, Wild Type*). Sin embargo, la ausencia de apoE hace que las lipoproteínas que la contienen no puedan ser captadas y metabolizadas eficientemente por sus receptores, por lo que se produce hipercolesterolemia con niveles elevados de colesterol-VLDL y niveles disminuidos de c-HDL comparado con ratones *WT*. Los niveles de triacilglicéridos (TAG) no están afectados en ratones *apoE*^{-/-} (**Figura 15**).

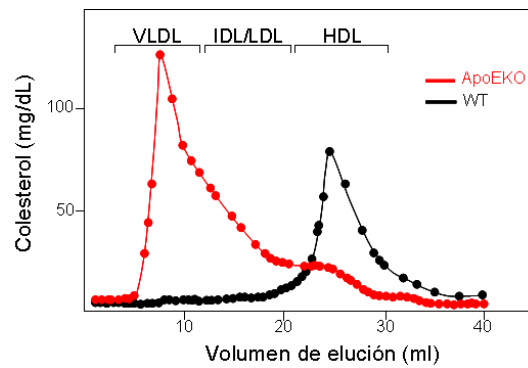


Figura 15. Perfil de lipoproteínas en ratones *apoE*^{-/-} y *WT*. Comparado con ratones *WT*, los ratones deficientes en apoE presentan niveles elevados de colesterol-VLDL y niveles bajos de c-HDL en plasma (Adaptado de Zhang et al, 1992).

La hipercolesterolemia propia de los ratones *apoE*^{-/-} desencadena el desarrollo de lesiones ateroscleróticas de manera espontánea, con formación de depósitos de células espumosas en la aorta proximal que producen oclusión grave de las arterias aproximadamente a los ocho meses de edad (Piedrahita et al., 1992; Zhang et al., 1992). Estos procesos se agravan significativamente cuando los ratones *apoE*^{-/-} son alimentados con dietas ricas en grasas y colesterol (Breslow, 1996; Smithies and Maeda, 1995). Cabe destacar que las placas ateromatosas que desarrollan los ratones *apoE*^{-/-} presentan características similares a las que se forman en humanos por lo que es un buen modelo animal para estudiar los mecanismos moleculares responsables del inicio y progresión de la aterosclerosis y para investigar los factores genéticos y ambientales que modifican el proceso aterogénico (Nakashima et al., 1994; Zhang et al., 1992).

4.2. El ratón deficiente en IRS2 y el ratón doble deficiente en IRS2 y apoE: modelos murinos de DMT2/SM y de aterosclerosis acelerada por DMT2/SM

Como se ha mencionado anteriormente, estudios con ratones modificados genéticamente han puesto de manifiesto un papel importante de IRS2 tanto en la función de las células β -pancreáticas como en la homeostasis de la glucosa y de la insulina (Burks and White, 2001). Uno de los mecanismos que inducen apoptosis de las células β -pancreáticas durante el desarrollo de la DMT2 es la alteración de los niveles de expresión de IRS2, pues se ha demostrado, tanto en humanos como en modelos animales, que la disminución de su expresión conduce a estados de RI y DMT2 (Baumgartl et al., 2006; Gunton et al., 2005; Nandi et al., 2004; Rhodes, 2005).

El ratón deficiente en IRS2 (*Irs2*^{-/-}), generado por inactivación mediante recombinación homóloga (Kubota et al., 2000; Withers et al., 1998), presenta alteraciones patológicas semejantes a las presentes en la DMT2 y el SM, incluyendo hiperglucemia (Kubota et al., 2000), hiperinsulinemia, RI (Gonzalez-Navarro et al., 2007; Kubota et al., 2000; Withers et al., 1998), hipertensión y dislipidemia (Kubota et al., 2003). Este fenotipo se debe a que la inactivación de IRS2 provoca una reducción en la masa de las células β -pancreáticas por un aumento en la apoptosis, causando un fallo en la secreción de insulina (Kubota et al., 2000; Withers et al., 1998). La RI y la falta de hiperplasia compensatoria de las células β -pancreáticas demuestran que IRS2 es esencial en el mantenimiento y regeneración de las células β -pancreáticas y que la señalización por insulina es necesaria para mantener la homeostasis de las células β -pancreáticas (Kubota et al., 2000). Además, el ratón *Irs2*^{-/-} muestra un incremento en el peso corporal, niveles elevados de leptina e infertilidad en las hembras (Burks et al., 2000). Por todo ello, el ratón *Irs2*^{-/-} se considera un buen modelo para estudiar las causas que contribuyen a la fisiopatología de la DMT2 y el SM en humanos.

Además, estudios recientes en nuestro laboratorio y en otros demuestran un papel relevante del gen IRS2 en la aterosclerosis (Baumgartl et al., 2006; Gonzalez-Navarro et al., 2007). Aunque la disrupción de IRS2 no es suficiente para promover aterosclerosis en el ratón, su inactivación combinada con la ausencia del gen apoE (ratón *apoE*^{-/-}*Irs2*^{-/-}) promueve el desarrollo de la aterosclerosis. De hecho, la inactivación total o selectiva de IRS2 en macrófagos de ratones *apoE*^{-/-} aumenta el desarrollo de la aterosclerosis en comparación con ratones *apoE*^{-/-} control con IRS2 intacto (**Figura 16**). Además, los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{-/-} muestran intolerancia a la glucosa, RI e hipercolesterolemia (Baumgartl et al., 2006; Gonzalez-Navarro et al., 2007), reforzando la asociación clínica entre RI, DMT2 y aterosclerosis.

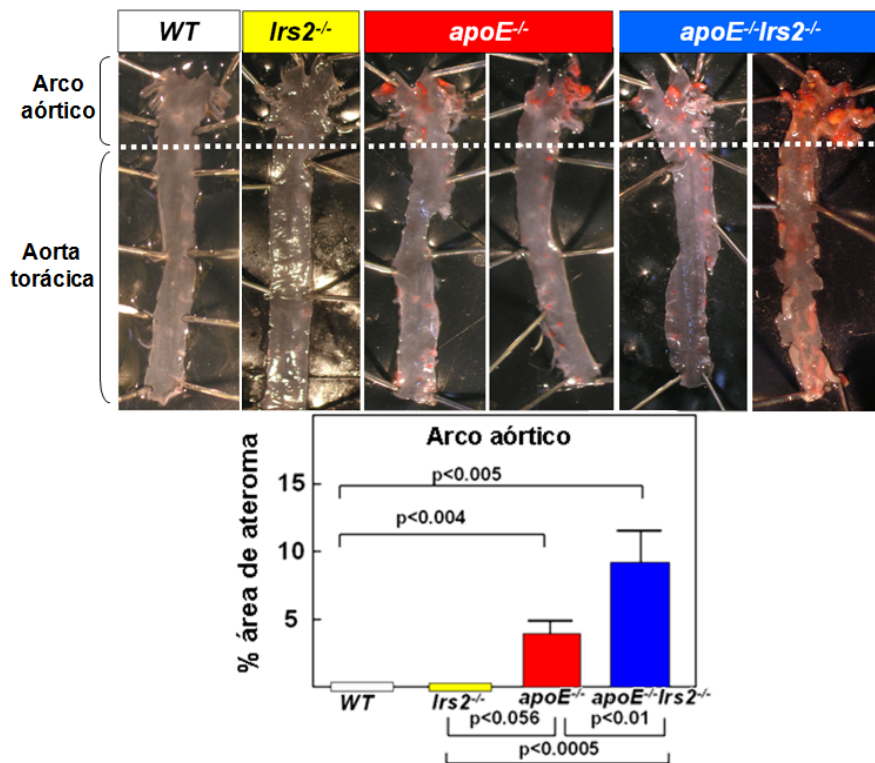


Figura 16. Aterosclerosis en modelos murinos de DMT2/SM, aterosclerosis y aterosclerosis acelerada por DMT2/SM. Los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{-/-}* doble deficientes en apoE e IRS2 muestran un aumento de la aterosclerosis en el cayado aórtico comparado con los ratones *apoE^{-/-}* con IRS2 intacto. En ratones *Irs2^{-/-}* las lesiones son inapreciables por lo que la ausencia de IRS2 *per se* no es suficiente para promover aterosclerosis (Adaptado de González-Navarro et al, 2007).

Además, en ratones *apoE^{-/-}Irs2^{-/-}* con RI se observa una correlación positiva entre los niveles circulantes de insulina y el tamaño de la lesión aterosclerótica que no se produce en ratones *apoE^{-/-}* (Gonzalez-Navarro et al., 2007) (Figura 17).

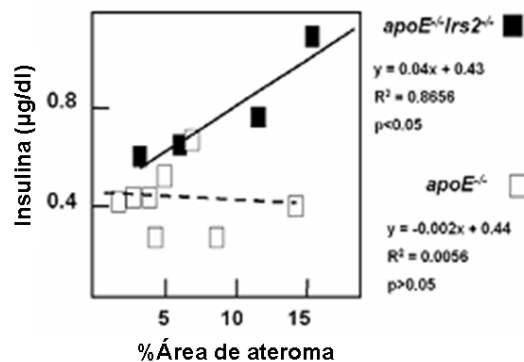


Figura 17. Correlación entre los niveles de insulina en plasma y el tamaño de la placa de ateroma. Los niveles circulantes en plasma de insulina correlacionan positivamente con el tamaño de la placa de ateroma en ratones *apoE^{-/-}Irs2^{-/-}* con RI pero no en ratones *apoE^{-/-}* con IRS2 intacto (Adaptado de González-Navarro et al, 2007).

5. PAPEL DEL LOCUS *Ink4/Arf* EN EL CICLO CELULAR Y EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

5.1. El ciclo celular. Generalidades

El ciclo celular es el proceso mediante el cual la célula duplica su contenido celular y se divide para generar dos células hijas. Se divide en cinco fases: G0 (no proliferativa o de quiescencia), G1 (del inglés, *Gap 1*), S (síntesis de ADN), G2 (del inglés, *Gap 2*) y M (mitosis).

En fase G0 la célula recibe estímulos extracelulares mitogénicos y entra en fase G1. Una vez en fase G1, las células regulan su transición entre las distintas fases del ciclo celular mediante diversos mecanismos moleculares de control. En mamíferos, la transición más relevante es G1/S, que se encuentra controlada a nivel del denominado punto de restricción. Este punto se considera como de no retorno y determina el momento en el cual la célula deja de depender de señales mitogénicas extracelulares para progresar en el ciclo (Malumbres and Barbacid, 2001) (**Figura 18**). En las dos siguientes fases las células llevan a cabo dos eventos claves en la división celular como son la replicación de los cromosomas en la fase S y su segregación en la fase M para garantizar que cada célula hija reciba una dotación completa del material hereditario. Entre estas dos fases se encuentra la fase G2, durante la cual se comprueba que la duplicación del material genético ha sido la correcta y si no es así la célula inicia el proceso de muerte celular por apoptosis.

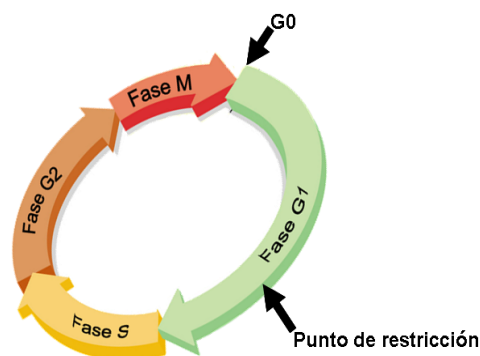


Figura 18. Fases del ciclo celular y punto de restricción. La célula en estado no proliferativo o de quiescencia, conocido como fase G0, entra en fase G1 tras recibir estímulos mitogénicos. Acabada la fase G1, se produce la entrada en fase S en la cual se produce la replicación del ADN. Tras la fase S, se inicia la fase G2 en la cual la célula se prepara para entrar en fase M o de mitosis. La transición G1/S es una de las más relevantes en mamíferos y está regulada por el denominado punto de restricción o de no retorno, que determina el momento en que la célula deja de depender de señales mitogénicas extracelulares para progresar en el ciclo.

5.1.1. Regulación del ciclo celular: ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas

El ciclo celular en eucariotas está regulado por una familia de protein-quinasas conocidas como CDKs (*del inglés, Cyclin Dependent Kinase*) cuya actividad requiere su asociación con una subunidad reguladora denominada ciclina. La actividad de los complejos CDK-ciclinas experimenta variaciones a lo largo del ciclo celular como consecuencia de la síntesis y degradación periódica de las ciclinas que inducen la entrada y salida de cada fase del ciclo celular (Morgan, 1995). En mamíferos, en la fase G1 temprana, aumenta la expresión de ciclinas tipo D (D1, D2 y D3) que forman complejos con CDK4 y CDK6 (Sherr, 1993). Los complejos CDK4/6-ciclina D fosforilan a miembros de la familia de la proteína del retinoblastoma (pRb) que, en su forma hipofosforilada, interacciona con el factor de transcripción E2F impidiendo la transcripción génica de sus genes diana (Weintraub et al., 1992). Cuando pRb es fosforilada por el complejo CDK4/6-ciclina D, E2F inicia la transcripción y síntesis de ciclinas tipo E (E1 y E2) que forman complejos CDK2-ciclina E en la fase G1 tardía e incrementan la fosforilación de pRb (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992). La consiguiente hiperfosforilación de pRb provoca la completa liberación de E2F, lo cual permite la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo y la replicación del ADN en la fase S (Fuster et al., 2010; Harbour and Dean, 2000). La expresión de las ciclinas tipo A (A1 y A2) durante la fase S facilita la formación de complejos CDK2-ciclina A que permiten la progresión del ciclo y la entrada en fase G2, durante la cual las ciclinas de tipo A forman complejos con CDK1 y, por último, se produce la síntesis de ciclinas tipo B (B1, B2 y B3) que se unen a CDK1 y regulan la transición G2/M (Nurse, 1994; Nurse et al., 1998; O'Farrell, 2001) culminando con la división celular (**Figura 19**).

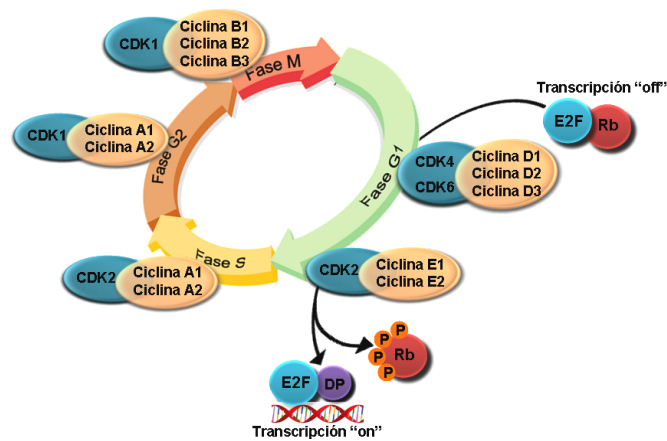


Figura 19. Ciclinas y CDKs implicadas en la regulación del ciclo celular. Cuando las células entran en estado proliferativo, las primeras CDKs en ser activadas son CDK4 y CDK6 por asociación a ciclinas de tipo D. A continuación se activan los complejos CDK4/6-ciclina D y posteriormente los complejos CDK2-ciclina E. La activación secuencial de estos complejos conduce a la hiperfosforilación de la proteína Rb y a la liberación del factor de transcripción E2F lo que permite la transcripción de genes implicados en la replicación del ADN y otros procesos necesarios para la progresión del ciclo celular. La activación de E2F provoca la inducción de la expresión de la ciclina A que interacciona con CDK2 permitiendo la progresión a través de la fase S. Tras la replicación del ADN, se forman los complejos CDK1-ciclina A y CDK1-ciclina B que inducen la entrada en mitosis (Adaptado de Fuster et al, 2011).

5.1.2. Regulación del ciclo celular: inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas

El ciclo celular está regulado además por polipéptidos conocidos como inhibidores de CDKs (CKIs, *del inglés Cyclin Kinase Inhibitor*) que regulan los complejos CDK-ciclinas. En mamíferos, los CKIs se dividen en dos familias: INK4 (*del inglés, Inhibitors of CDK4*) y Cip-Kip (*del inglés, CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*).

Los cuatro miembros de la familia INK4, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d} limitan la transición desde la fase G1 a la fase S uniéndose específicamente a CDK4 y CDK6 e inhibiendo su actividad (Sherr and Roberts, 1995). En concreto, p16^{INK4a} evita la formación de los complejos CDK4/6-ciclina D y la entrada en la fase S (Serrano, 1997), mientras que la inducción de p15^{INK4b} provoca la parada del ciclo en G1 en respuesta a factores de crecimiento como TGF-β (Hannon and Beach, 1994). Por otra parte, p18^{INK4c} y p19^{INK4d} se expresan durante el desarrollo embrionario y parecen desempeñar un papel clave en la diferenciación (Zindy et al., 1997) (**Figura 21**). Cada miembro de la familia INK4 está codificado por un único gen localizado en los siguientes cromosomas humanos: p16^{INK4a} y p15^{INK4b} en el cromosoma 9p21, p18^{INK4c} en el cromosoma 1p32, y p19^{INK4d} en el cromosoma 19p13 (**Figura 20**).

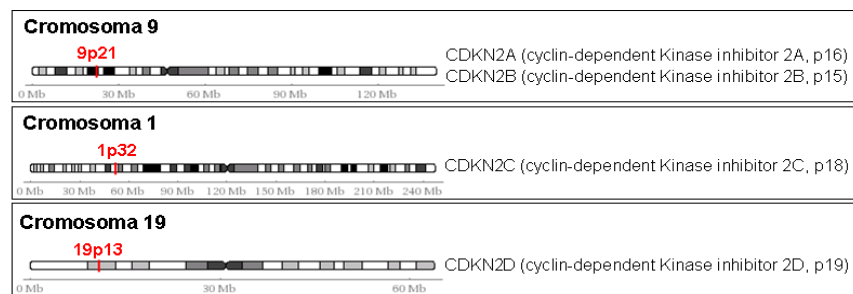


Figura 20. Localización cromosómica de los genes INK4. La familia INK4 comprende cuatro genes denominados ink4a, ink4b, ink4c y ink4d según en el orden en el que fueron descritos sus productos génicos que se corresponden con proteínas que oscilan entre 15 y 19 KDa de peso molecular: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}. Las proteínas INK4 comparten entre ellas una homología del 40%. Además, están altamente conservadas entre especies, con un 90% de similitud entre las proteínas de ratón y humanos.

La familia Cip-Kip comprende tres miembros: p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. p21^{Cip1} incrementa la estabilidad de las ciclinas tipo D promoviendo la activación de los complejos CDK4/6-ciclina D. Además, produce la parada del ciclo celular en la fase G1 al inhibir la actividad de los complejos CDK2-ciclina E necesarios para que se produzca la transición G1/S. p27^{Kip1} inhibe el complejo CDK2-ciclina E regulando, igualmente, la transición G1/S. p57^{Kip2} actúa durante el desarrollo embrionario inhibiendo la actividad de los complejos CDK2-ciclina E y su disminución conduce a desórdenes en el mismo (Sherr, 2000) (Figura 21).

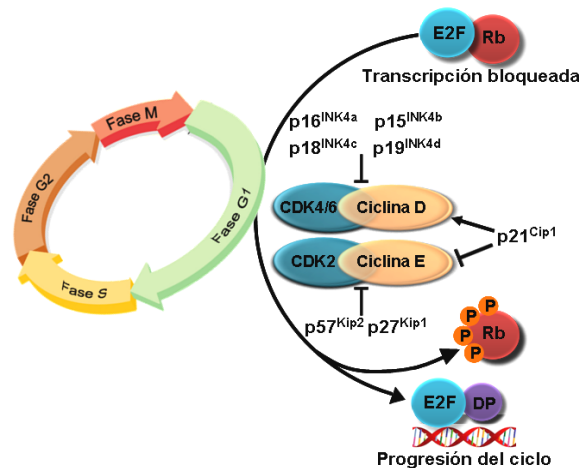


Figura 21. Regulación del ciclo celular en la fase G1 por CKIs. La transición G1/S está regulada por CKIs de las familias INK4 (proteínas p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}), que regulan exclusivamente a CDK4 y CDK6 en la fase G1) y Cip-Kip (proteínas p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}). p21^{Cip1} inhibe la actividad de los complejos CDK2/ciclina E necesarios para que se produzca la transición G1/S, por lo que su expresión provoca la parada del ciclo en G1 y estabiliza los complejos CDK4/6-ciclina D. p27^{Kip1} inhibe el complejo CDK2/ciclina E regulando también la transición G1/S. p57^{Kip2} actúa durante el desarrollo embrionario y su disminución conduce a desórdenes en el mismo (Adaptado de Fuster et al, 2011).

5.2. El locus *Ink4/Arf*

5.2.1. Estructura génica del locus *Ink4/Arf*

En 1994 se localizó en el cromosoma humano 9p21 un gen supresor de tumores al que se denominó MTS1 (*del inglés, Multiple Tumor Suppressor 1*) (Kamb et al., 1994). Este gen había sido descrito previamente como un inhibidor del ciclo celular (Serrano et al., 1993) y hoy es conocido como $p16^{INK4a}$. Análisis posteriores del cromosoma 9p21 pusieron de manifiesto un segundo gen supresor tumoral identificado independientemente como un miembro de la familia INK4, al que se llamó $p15^{INK4b}$ o MTS2 (Hannon and Beach, 1994; Kamb et al., 1994). Además, el locus que codifica para el gen $p16^{INK4a}$ da lugar a un segundo producto génico: la proteína $p14^{ARF}$ en humanos y $p19^{ARF}$ en ratones (*del inglés, Alternative Reading Frame*) (Quelle et al., 1995). Al locus que contiene estos tres productos génicos se le denominó locus *Ink4/Arf* y el proyecto Genoma Humano acuñó los términos CDKN2A y CDKN2B para designar, respectivamente, al locus *Ink4a/Arf*, que codifica para las proteínas $p16^{INK4a}$ y ARF, y al locus *Ink4b*, que codifica para la proteína $p15^{INK4b}$. El gen CDKN2A posee cuatro exones: exón 1, exón 2, exón 1 α y exón 1 β . Los exones 1 α , 2 y 3 codifican para la proteína $p16^{INK4a}$ mientras que ARF combina los exones 1 β , 2 y 3. Aunque ambos genes comparten exones, los productos génicos no comparten homología de secuencia debido a la presencia de promotores independientes que producen un cambio en la pauta de lectura. El gen CDKN2B posee 2 exones que codifican para la proteína $p15^{INK4b}$ (Berger and Bardeesy, 2007) (**Figura 22**).

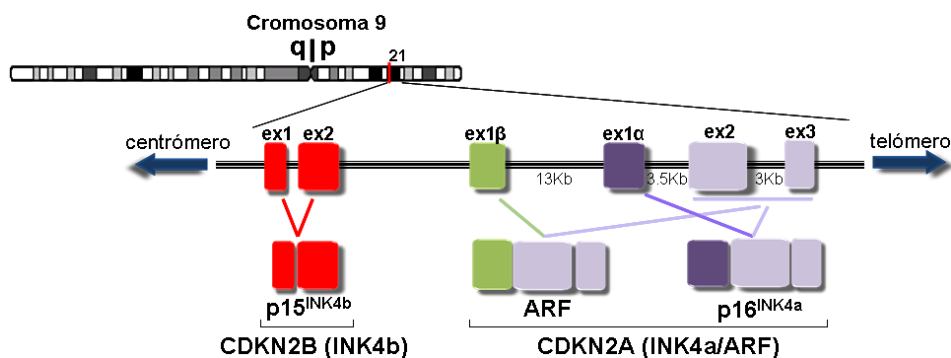


Figura 22. Estructura del locus *Ink4/Arf*. En humanos, ratones y ratas, la estructura del locus *Ink4/Arf* está altamente conservada. Los exones 1 y 2 del gen CDKN2B (*Ink4b*) codifican para la proteína $p15^{INK4b}$. El gen CDKN2A (*Ink4a/Arf*) origina dos transcritos que codifican para las proteínas ARF y $p16^{INK4a}$. Ambas proteínas no son homólogas al utilizar pautas de lectura diferentes y promotores diferentes, de modo que comparten los exones 2 y 3, pero el exón 1 α es específico de $p16^{INK4a}$ y el exón 1 β es específico de ARF (Adaptado de Ortega et al, 2002).

En humanos se ha descubierto un cuarto gen en el locus *Ink4/Arf*, denominado CDKN2BAS (*del inglés, CDKN2B AntiSense*), que codifica para un ARN no codificante antisentido denominado ANRIL (*del inglés, Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus*). Este gen, que presumiblemente regula la expresión de los genes CDKN2A y CDKN2B, abarca una región de 126.3 Kb y contiene 19 exones. El exón 1, localizado en el promotor del gen ARF, se superpone a los dos exones del gen CDKN2B y se transcribe en sentido opuesto al grupo de genes CDKN2B-CDKN2A (Pasmant et al., 2010) (**Figura 23**).

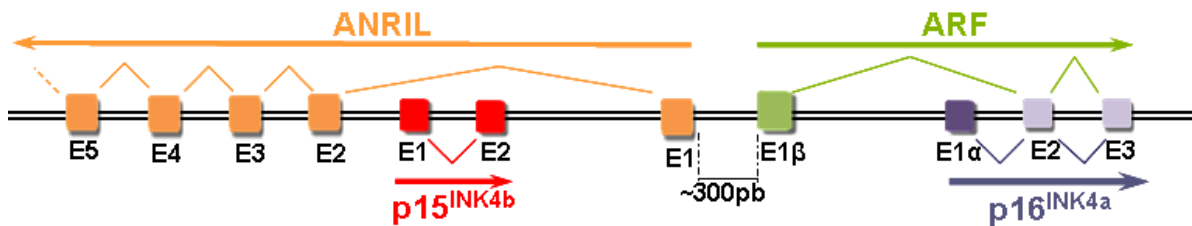


Figura 23. Organización genómica de CDKN2A/B y ANRIL. ANRIL es un ARN antisentido que se superpone a los dos exones del gen CDKN2B y se transcribe en la dirección opuesta al grupo de genes p15/CDKN2B-p16/CDKN2A-ARF. El exón 1 (E1) de ANRIL se encuentra situado aproximadamente a 300 pares de bases del exón 1 β , lugar de comienzo de la transcripción de ARF (*Adaptado de Pasmant et al, 2007*).

En el ratón, el locus *Ink4/Arf* se encuentra en el cromosoma 4 (Jiang et al., 1995; Quelle et al., 1995) y se desconoce la existencia del gen CDKN2BAS (Visel et al., 2010).

5.2.2. Papel del locus *Ink4/Arf* en el ciclo celular, senescencia y apoptosis

La transcripción del locus *Ink4/Arf* se activa en respuesta a estrés oncogénico, resultando en parada del ciclo celular o apoptosis, por lo que se considera que actúa como una de las principales barreras anti-oncogénicas en mamíferos (Gil and Peters, 2006; Serrano, 2000).

De los tres productos génicos del locus *Ink4/Arf*, los CKIs p16^{INK4a} y p15^{INK4b} inhiben la proliferación celular formando complejos con CDK4 y CDK6, lo cual bloquea la hiperfosforilación de RB necesaria para la progresión del ciclo celular. ARF, aunque no es un CKI, regula el ciclo a través de la vía del gen supresor de tumores p53 (vía de p53). Tras la activación por estímulos oncogénicos, ARF se une a las ubiquitín-ligasas MDM2 (conocida como HDM2 en humanos) y ARF-BP1/Mule (*del inglés, ARF Binding*

Protein 1/Mcl1-ubiquitin ligase E3), atenuando su función como ubiquitín-ligasas y estabilizando la actividad del oncosupresor p53 (Chen et al., 2005; Weber et al., 1999) (Figura 24).

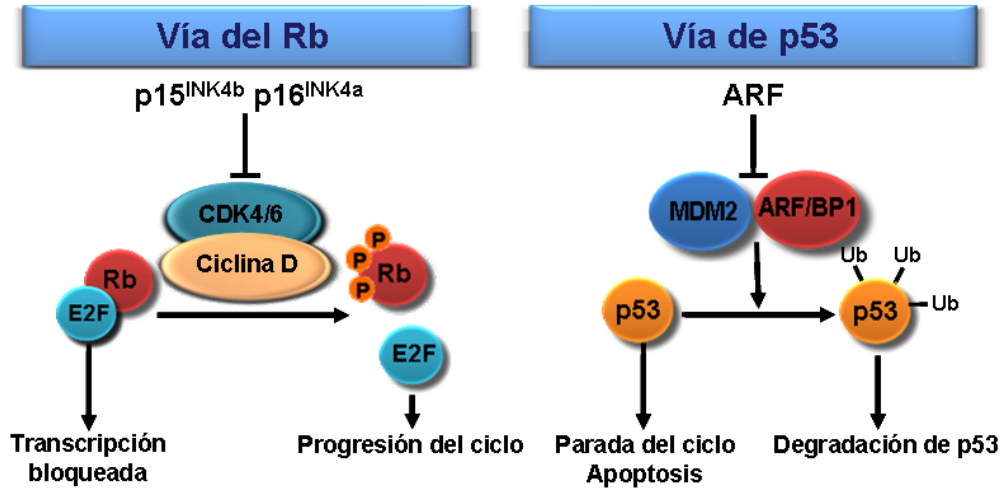


Figura 24. Modulación del ciclo celular mediada por los productos génicos del locus *Ink4/Arf*. p15^{INK4b} y p16^{INK4a}, dos de los cuatro CKIs de la familia INK4, inhiben la proliferación celular al unirse a CDK4/6 e impedir la fosforilación de Rb. ARF provoca la acumulación de la proteína p53 al inhibir la ubiquitín-ligasa MDM2 necesaria para su degradación, de modo que la célula se detiene en la fase G1 y se activa la apoptosis (Berger and Bardeesy, 2007).

La proteína p21^{Cip1} regula las vías del Rb y p53. En concreto, p53 activa transcripcionalmente la expresión de p21^{Cip1} que a su vez inhibe los complejos CDK2-ciclina A y CDK2-ciclina E, impide la completa fosforilación de pRb y provoca la parada del ciclo celular en la fase G1 (Berger and Bardeesy, 2007; Satyanarayana and Rudolph, 2004) (Figura 25).

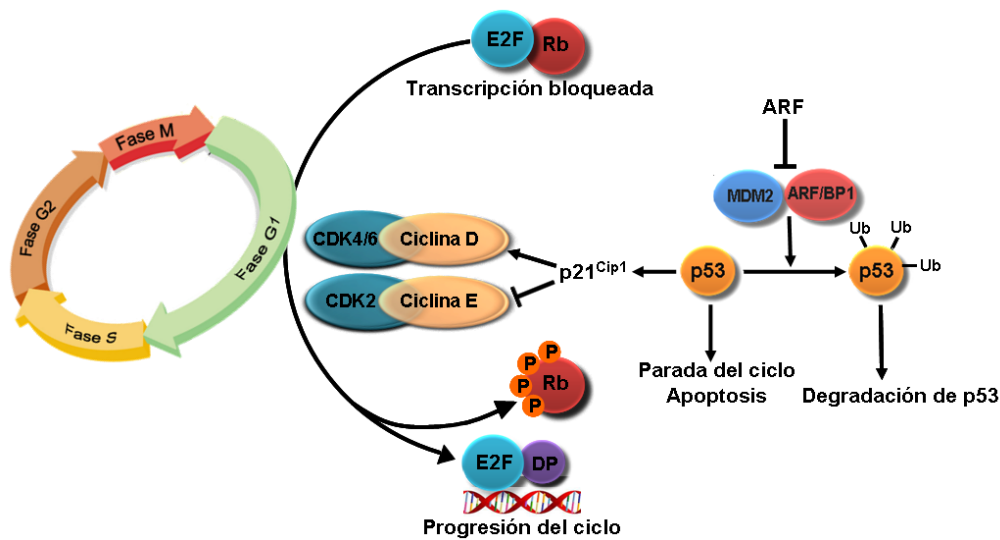


Figura 25. Papel de ARF en el ciclo celular mediada por p53 y p21^{Cip1}. Además de estimular apoptosis vía activación de ARF, p53 también inhibe proliferación celular al activar la expresión de la proteína p21^{Cip1}, la cual inhibe la actividad de los complejos CDK2/ciclina E impidiendo la fosforilación de pRb. Además, p21^{Cip1} estabiliza los complejos CDK4/6-ciclina D (Adaptado de Fuster et al, 2011 y Berger and Bardeesy, 2007).

El locus *Ink4/Arf* juega un papel crucial durante la senescencia celular, un proceso caracterizado por detención permanente del ciclo celular que perjudica la capacidad de regeneración tisular durante el envejecimiento (Gil and Peters, 2006).. Sin embargo, la senescencia es también considerada como el principal mecanismo de supresión tumoral que protege al organismo frente al cáncer. Los estímulos identificados como inductores de la senescencia incluyen, entre otros, el acortamiento de los telómeros (senescencia replicativa), daño en el ADN, estrés oxidativo y la estimulación por mitógenos (senescencia prematura). La inducción de la senescencia durante el envejecimiento produce la activación transcripcional del locus *Ink4a/Arf* con la consiguiente acumulación de p16^{INK4a} y parada del ciclo celular (Satyanarayana and Rudolph, 2004). La expresión de p16^{INK4a} y ARF en distintos tejidos aumenta considerablemente con la edad, tanto en ratones como en humanos (Collado et al., 2007; Krishnamurthy et al., 2004; Satyanarayana and Rudolph, 2004; Zindy et al., 1997). Por el contrario, el locus *Ink4b* no se sobreexpresa durante el envejecimiento (Zindy et al., 1997).

Por otra parte, el locus *Ink4/Arf* está implicado en la respuesta apoptótica a través de la función que ejerce ARF estabilizando la proteína proapoptótica p53. En respuesta a señales mitogénicas, p53 actúa como un potente supresor de tumores

gracias a su capacidad para inducir la muerte celular por apoptosis, proceso que permite la eliminación de células tumorales emergentes (Sherr, 2000). De hecho, la actividad anti-envejecimiento de ARF está mediada por la estabilización de p53 que induce la expresión de genes antioxidantes y facilita la eliminación de células que han acumulado daños irreversibles (Vousden and Lane, 2007).

5.2.3. Regulación del locus *Ink4/Arf*: activadores y represores de su expresión

Las señales que inducen la sobreexpresión de p16^{INK4a} se asocian con estrés oncogénico y agentes inflamatorios. Por ejemplo, la actividad oncogénica de Ras (Serrano et al., 1997) y factores transcripcionales de la familia Ets (Ohtani et al., 2001) inducen la expresión de p16^{INK4a}. A su vez la activación de Ets1/2 está mediada por señalización dependiente de ERK (Paumelle et al., 2002; Wasyluk et al., 1997) y p38MAPK, por lo que la expresión de p16^{INK4a} se asocia a la activación de p38MAPK (Tanaka et al., 1998). La expresión de p16^{INK4a} también se induce por factores de transcripción de la familia AP1, como JunB, cuya transcripción está a su vez regulada por la vía Ras/MAPK (Passegue and Wagner, 2000). Oncoproteínas como Myc o el factor de transcripción E2F promueven del mismo modo parada en el ciclo celular por un mecanismo dependiente de p16^{INK4a} (Matsumura et al., 2003).

La expresión de ARF se activa también por señales mitogénicas inducidas por oncoproteínas como Myc (Zindy et al., 1998), Ras (Palmero et al., 1998) o E1a (Serrano, 2000), por factores de transcripción como E2F1 (Elliott et al., 2001; Hiebert et al., 1995; Mason et al., 2002), c-Jun (Ameyar-Zazoua et al., 2005) y DMP-1 (Inoue et al., 1999), o por virus como Abl (Radfar et al., 1998). Además, como ocurre con p16^{INK4a}, la activación de p38MAPK provoca un aumento en la expresión de ARF (Bulavin et al., 2004). Esta inducción por mitógenos lleva a las células a parada en el ciclo y apoptosis. Finalmente, se ha demostrado que la expresión de p15^{INK4b} se activa en respuesta al factor de crecimiento TGF- β (Hannon and Beach, 1994; Reynisdottir et al., 1995) y a Ras (Malumbres et al., 2000) (**Figura 26**).

Otros mecanismos de control de senescencia celular se asocian a regulación de la expresión de p16^{INK4a} mediada por factores de transcripción de las familias Id (Id1,3) y AP1 (c-Jun) o TBX (Alani et al., 2001; Ohtani et al., 2001), regulación de ARF vía Rb (Rowland et al., 2002), Twist (Maestro et al., 1999), JunD y factores T-box (Jacobs et

al., 2000), y regulación del locus *Ink4b* dependiente de Myc (Zindy et al., 1998) y factores T-box como TBX2 (**Figura 26**).

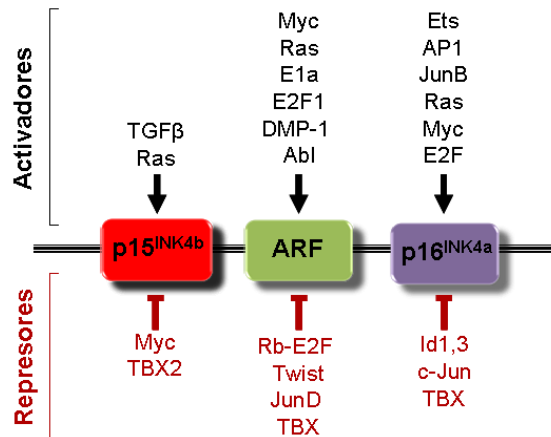


Figura 26. Activadores y represores de la expresión del locus *Ink4/Arf*. Representación de los activadores y represores de la expresión de los distintos miembros del locus *Ink4/Arf* (Adaptado de Gil y Peters, 2006).

5.3. Estudios de asociación genética a gran escala en el locus *Ink4/Arf*

Estudios de asociación genética a gran escala (GWA, *del inglés, genome-wide association*) han demostrado asociaciones genéticas entre polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, *del inglés, Single Nucleotide Polymorphisms*) situados en una región del cromosoma 9p21 cercana al locus *Ink4/Arf* y el riesgo de sufrir ciertas enfermedades asociadas al envejecimiento, como ECV, DMT2, y fragilidad (Sharpless and DePinho, 2007). Además, esta región génica ha sido asociada a mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cánceres (Debniak et al., 2005; Gayther et al., 2007; Healy et al., 2007; Kumar et al., 2001; Shete et al., 2009). Estas asociaciones genotipo-enfermedad han sido replicadas en múltiples estudios independientes (Broadbent et al., 2008; Burd et al., 2010; Consortium., 2007; Cunnington and Keavney, 2011; Doria et al., 2008; Folkersen et al., 2009; Helgadottir et al., 2007; Holdt et al., 2010; Kathiresan et al., 2009; Liu et al., 2009; McPherson et al., 2007; Samani et al., 2007; Visel et al., 2010). Además, son independientes de factores de riesgo cardiovascular “clásicos”, como hipertensión, obesidad, tabaquismo o hiperlipidemia (Burd et al., 2010) (**Figura 27**).

Por otro lado, la disminución en la capacidad proliferativa de las células β -pancreáticas durante el desarrollo de la DMT2 (Krishnamurthy et al., 2006) sugiere que reguladores del ciclo celular como el locus *Ink4/Arf* pueden ser claves en el desarrollo

de la DMT2. Análisis de asociación génica confirman la evidencia de una asociación consistente en el cromosoma 9p21 entre el SNP rs10811661 y DMT2 (Saxena et al., 2007; Scott et al., 2007; Zeggini et al., 2007). El SNP rs564398, ampliamente estudiado (Cugino et al., 2011; Duesing et al., 2008; Zeggini et al., 2007), está sujeto a controversia, aunque su asociación es más consistente que para el resto de SNP identificados en el resto de estudios (Consortium., 2007; Doria et al., 2008) (**Figura 27**).

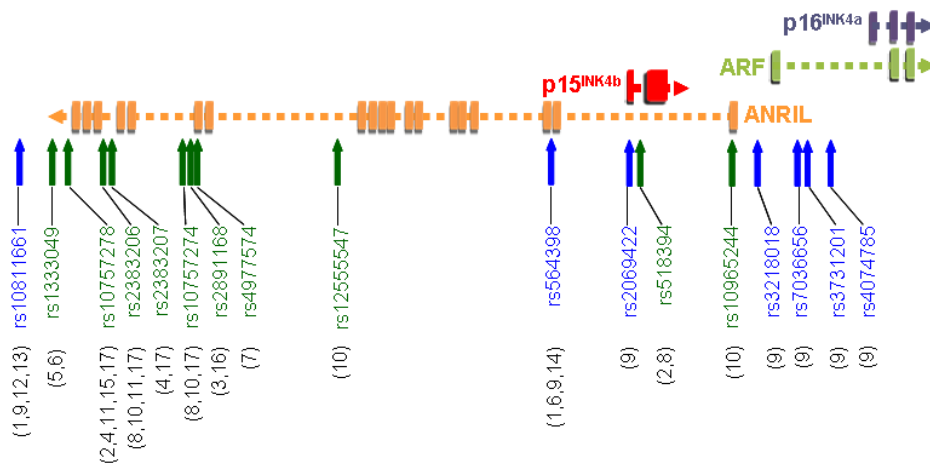


Figura 27. Principales SNPs asociados a ECV y DMT2. Estudios genéticos a gran escala han identificado polimorfismos en el locus *Ink4/Arf* asociados a aterosclerosis y ECV (flechas verdes) y DMT2 (flechas azules). La numeración referencia a los autores (1, Zeggini et al, 2007; 2, Liu et al, 2009; 3, Broadbent et al, 2008; 4, Helgadottir et al,2007; 5, Samani et al, 2007; 6, Consortium, 2009; 7, Kathiresan et al, 2009; 8, McPherson et al, 2007; 9, Duesing et al, 2008; 10, Visel et al, 2010; 11, Doria et al, 2008; 12, Scott et al, 2007; 13, Saxena et al, 2007; 14, Cugino et al, 2011 ; 15, Burd et al, 2010; 16, Folkersen et al, 2009; 17, Holdt et al, 2009).

5.4. Papel del locus *Ink4/Arf* en el envejecimiento: el ratón transgénico *Super-Ink4/Arf*

Varios estudios realizados en ratones y en humanos han demostrado un aumento dependiente de la edad de la expresión del locus *Ink4/Arf* en diferentes tejidos que podría limitar el potencial regenerativo de las células madre (Collado et al., 2007; Kim and Sharpless, 2006; Krishnamurthy et al., 2004; Ressler et al., 2006; Satyanarayana and Rudolph, 2004; Zindy et al., 1997). Este hecho indica que el locus *Ink4/Arf* podría desempeñar un importante papel pro-envejecimiento. Sin embargo existen varias evidencias que un potencial regenerador máximo puede ser perjudicial para el mantenimiento a largo plazo de las células madre (Collado et al., 2007; Sharpless and DePinho, 2007). Así, se ha propuesto que la expresión de *Ink4/Arf* inducida por la

edad podría representar una respuesta defensiva anti-envejecimiento para evitar el agotamiento de las células madre (Collado et al., 2007). De hecho, p16^{INK4a} y ARF protegen en el ratón frente al desarrollo de enfermedades asociadas a la edad, como son la aterosclerosis y el cáncer (Gonzalez-Navarro et al., 2010; Kuo et al., 2011) (Matheu et al., 2009; Matheu et al., 2004). Todavía queda por determinar si el locus *Ink4/Arf* es pro-envejecimiento, anti-envejecimiento o si sus efectos nocivos o beneficiosos dependen del tejido considerado.

Además, ratones transgénicos *Super-Ink4/Arf* con ganancia de función del locus *Ink4/Arf* son resistentes frente al cáncer y expresan diferentes marcadores anti-envejecimiento (Matheu et al., 2009; Matheu et al., 2004). El ratón *Super-Ink4/Arf* se generó por inyección de oocitos fertilizados que portaban un segmento genómico de 77 Kb, clonado en el vector PAC pAd10SacBII (cromosoma artificial P1), que contenía la estructura completa de los tres genes p15^{INK4b}, ARF y p16^{INK4a} (Matheu et al., 2004) (Figura 28).

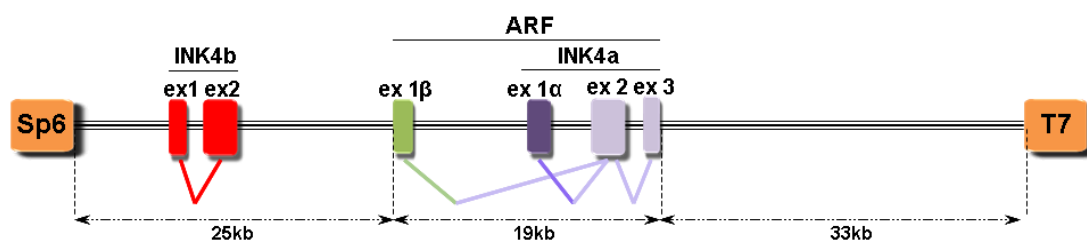


Figura 28. Estructura del transgén utilizado para la generación de los ratones *Super-Ink4/Arf*. El transgén contiene la estructura completa de los tres genes, INK4b, ARF e INK4a. Sp6 y T7 representan secuencias terminales, de aproximadamente 20 pares de bases, insertadas en el transgén con la finalidad de identificarlo mediante PCR (Adaptado de Matheu et al., 2004).

Los ratones *Super-Ink4/Arf* son viables y fértiles. Los ratones *Super-Ink4/Arf* con una copia extra del locus muestran un incremento moderado en la expresión de p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y ARF en varios tejidos a edades avanzadas. Además, comparados con controles, son más resistentes al cáncer inducido tanto por agentes químicos como al cáncer espontáneo asociado al envejecimiento y muestran una esperanza de vida y un envejecimiento normal (Matheu et al., 2007; Matheu et al., 2004). Es más, la presencia de dos copias del locus *Ink4/Arf* en los ratones transgénicos *Super-Ink4/Arf*, no solo aumenta la resistencia al cáncer, si no que también mejora la esperanza de vida, debido probablemente a un aumento en la quiescencia celular y a una disminución de la proliferación celular innecesaria (Matheu et al., 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVO 1. Estudiar el papel de IRS2 en el desarrollo de resistencia a insulina, síndrome metabólico y arteriosclerosis

En el ratón, la inactivación completa del gen que codifica para IRS2 (*Irs2*^{-/-}) provoca RI, SM y acelera la aterosclerosis. Con la finalidad de profundizar en los mecanismos moleculares implicados en estos procesos patológicos nos planteamos los siguientes objetivos:

1.1. Estudiar la expresión de la ruta de la señalización de la insulina mediada por IRS2 en CMSPs de pacientes con SM sensibles y resistentes a insulina.

1.2. Estudiar el efecto de la inactivación parcial de IRS2 sobre el desarrollo de la placa de ateroma en ratones hipercolesterolémicos deficientes en apoE.

1.3. Estudiar el efecto del bloqueo de la ruta de la señalización de la insulina en la secreción de citoquinas proaterogénicas.

OBJETIVO 2. Estudiar el papel del locus *Ink4/Arf* en el desarrollo de resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa asociada a la edad

Estudios genéticos a gran escala en humanos han demostrado recientemente una asociación entre polimorfismos de base única en la región cromosómica 9p21 cerca del locus *Ink4/Arf* y un mayor riesgo de desarrollar DMT2. En la presente tesis, investigamos el efecto del incremento de la expresión del locus *Ink4/Arf* en la homeostasis de la glucosa y de la insulina en condiciones de envejecimiento fisiológico normal. Para este fin utilizamos ratones transgénicos *Super-Ink4/Arf* portadores de una copia extra del locus *Ink4/Arf* que se comporta de manera similar al gen endógeno, con una expresión muy reducida en células primarias embrionarias y un aumento en la expresión en respuesta a estímulos mitogénicos (Matheu et al., 2004). En concreto, se plantearon los siguientes objetivos:

2.1. Estudiar el papel del locus *Ink4/Arf* en la homeostasis de la glucosa y la insulina durante el envejecimiento.

2.2. Estudiar el papel del locus *Ink4/Arf* en la funcionalidad de las células β de los islotes pancreáticos.

2.3. Estudiar el papel del locus *Ink4/Arf* en la señalización de la insulina en diferentes tejidos diana.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIOS *IN VIVO* EN RATONES

1.1. Ratones, genotipado y dietas

Los ratones utilizados en este estudio fueron estabulados en el animalario del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC) y en el de la Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia-INCLIVA. El manejo de los ratones y los procedimientos experimentales siguieron las normativas vigentes para el cuidado de animales de experimentación.

Para la generación de los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* se cruzaron ratones *Irs2^{-/-}* (C57BL/6J) y ratones *apoE^{-/-}* (C57BL/6J, CHARLES RIVER, Lyon, Francia). El genotipado se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *del inglés, Polymerase Chain Reaction*) que permite la amplificación de fragmentos de ADN mediante la acción de la enzima ADN polimerasa siendo éste un proceso secuencial y repetitivo que consiste en la desnaturalización del ADN, el emparejamiento de los cebadores en los extremos de la región a amplificar y su posterior extensión (Mullis and Faloona, 1987). Los cebadores utilizados para la detección de *apoE* y de *Irs2* (Gonzalez-Navarro et al., 2007; Withers et al., 1998) se muestran en la **tabla 3**.

Para los estudios del papel del locus *Ink4/Arf* los ratones transgénicos *Super-Ink4/Arf* (C57BL/6J), con una copia extra del locus (Matheu et al., 2004), se cruzaron con ratones *WT* (C57BL/6J, CHARLES RIVER, Barcelona, España) para generar los dos grupos experimentales. La presencia de la copia extra del transgén se realizó mediante dos reacciones de PCR independientes, para evitar falsos negativos, que detectan la secuencia terminal transgénica adyacente al elemento flanqueante T7 usando los pares de cebadores T7-PAC/T7-tg1 y T7-PAC/T7-tg2 que se indican en la **tabla 3**.

Tabla 3. Cebadores y condiciones de las reacciones de PCR para el genotipado de cada gen.

GEN	CEBADORES			
APOE	OIMR180 (5'-GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG-3') OIMR181 (5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3') OIMR182 (5'-GCCGCCCGACTGCATCT-3')			
IRS2	Neo (5'-GCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG-3') Upper (5'-CTTGGCTACCATGTTGTTATTGTC-3') Lower (5'-AGCTCTGGAGGTTACTTTCCCTAG-3')			
INK4/ARF	T7-tg1 (5'-AGTCAGAGGGTGGATGGG-3') T7-tg2 (5'-AAGCACTGAACCACCAA-3') T7-PAC (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')			

GEN	CICLOS	DESNATURALIZACIÓN	EMPAREJAMIENTO	ELONGACIÓN
APOE	38	94,0°C, 5 minutos	94,0°C, 20 segundos	62,0°C, 30 segundos
IRS2	34	94,0°C, 1 minuto	94,0°C, 30 segundos	57,0°C, 30 segundos
INK4/ARF	4 28 9	94,0°C, 5 minutos	94,0°C, 20 segundos 94,0°C, 45 segundos 94,0°C, 45 segundos	65,0°C, 45 segundos 65,0°C, 45 segundos 51,0°C, 45 segundos

En el estudio del papel de la proteína *Irs2* en la aterosclerosis ratones macho *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* y controles *apoE^{-/-}* fueron alimentados con dieta control con bajo contenido en grasa durante 10 meses (dieta estándar 2.8 % de grasa; PANLAB, Barcelona, España) o sometidos a una dieta rica en grasas (dieta aterogénica) durante 2 y 3 meses (10.8% de grasa total, 0.75% de colesterol, S8492 - E010, SSNIFF, Alemania).

Para los estudios del papel del locus *Ink4/Arf* en el metabolismo glucémico los ratones fueron alimentados con una dieta estándar (2.8% de grasa; PANLAB, Barcelona, España) hasta el momento del sacrificio a 0.5 y 1 año de edad. Los estudios fueron llevados a cabo en machos.

1.2. Medidas metabólicas en ratones

1.2.1. Determinación de lípidos circulantes en plasma

Se evaluaron los niveles plasmáticos de lípidos en ratones ayunados durante 15 horas mediante el empleo de kits comerciales (WAKO, St. Louis, MI, EEUU) basados en procedimientos enzimáticos. El plasma se obtuvo tras centrifugación de la sangre durante 30 minutos a 12.000rpm y a 4°C usando como anticoagulante EDTA (Ethilenediaminetetraacetic acid Disodium Salt Dihydrate, SIGMA, St. Louis, USA).

Para la determinación de triglicéridos, se empleó el kit “*LabAssay Triglyceride*”: los triglicéridos plasmáticos se hidrolizaron, por catálisis de la lipoproteína lipasa, a ácidos grasos libres y glicerol y este último se oxidó por catálisis de glicerol-3-fosfato oxidasa a un producto azulado que se determinó mediante colorimetría a 600nm de longitud de onda. Para la determinación del c-Total se empleó el kit “*LabAssay Cholesterol*”: el colesterol plasmático se oxidó por catálisis de la colesterol oxidasa, liberando peróxido de hidrógeno, que actuó como oxidante del reactivo 4-aminoantipirina, dando lugar a un producto azulado que se determinó colorimétricamente a 600nm de longitud de onda. El c-HDL se determinó de la misma forma que el c-Total tras la precipitación de lipoproteínas ricas en apoB. Para ratones *apoE*^{-/-} con altos niveles de lipoproteínas ricas en apoB se utilizó para la precipitación MgCl₂ 1M y 20g/L de sulfato de dextrano (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) (Gonzalez-Navarro et al., 2004) mientras que la precipitación en el resto de los grupos experimentales se realizó con CaCl 0.3M y 140U/mg de heparina cálcica (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU).

1.2.2. Estudios de tolerancia a la glucosa y determinación de glucosa e insulina

La tolerancia a la glucosa se determinó mediante tests de tolerancia a la glucosa (TTG). Tras 15-17 horas de ayuno a los ratones se les inyectó intraperitonealmente una solución de glucosa al 20% (2g/Kg de peso corporal, SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) y se analizaron los niveles de glucosa e insulina a diferentes tiempos (basal, 15, 30, 60 y 120 minutos). Los niveles de glucosa se midieron en sangre utilizando un glucómetro (Ascensia Elite, BAYER, Leverkusen, Alemania) y los resultados se analizaron calculando el área debajo de la curva (AUC, *del inglés, Area Under the Curve*).

Los niveles de insulina se determinaron en plasma de ratón mediante técnicas de ELISA (*del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) según las instrucciones del fabricante (MERCODIA, Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Uppsala, Suecia). El método utilizado está basado en la técnica directa de sándwich ELISA en donde dos anticuerpos monoclonales están dirigidos contra determinantes antigénicos independientes de la molécula de insulina. Durante la incubación (2 horas a temperatura ambiente con agitación) la insulina de la muestra reacciona con el anticuerpo anti-insulina unido a la placa y con el anticuerpo anti-insulina conjugado a la enzima peroxidasa. Tras varios lavados para la eliminación del exceso de enzima no unido a la insulina el inmunocomplejo se detecta por reacción con el sustrato TMB

(3,3',5,5' tetramethylbenzidine). La reacción se detiene mediante la adición de H₂SO₄ 0.5 M para dar un punto final colorimétrico que se lee espectrofotométricamente a una absorbancia de 450nm. Se siguieron las instrucciones del fabricante y se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de insulina, en un rango entre 0.175 y 6.5µg/L, en la que se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras a cuantificar. Tanto de los calibradores como de las muestras se utilizó un volumen de 25µL. Los resultados se analizaron calculando el AUC.

1.2.3. Estudios de tolerancia a la insulina

Los estudios de tolerancia a la insulina se llevaron a cabo mediante test de tolerancia a la insulina (TTI) en ratones ayunados durante 5 horas. Tras inyección peritoneal de 0.25U de insulina/Kg de peso (Humulina regular 100UI/mL, LILLY Indianápolis, Indiana, EE.UU) se analizaron los niveles de glucosa en sangre usando un glucómetro (Ascensia Elite, BAYER, Leverkusen, Alemania) a diferentes tiempos (basal, 15, 30, 60 y 90 minutos). Los resultados fueron analizados mediante el AUC.

1.3. Obtención y procesamiento de tejidos de ratón para el análisis histopatológico

Para la obtención de la aorta, del corazón y del páncreas los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se procedió a la disección longitudinal desde la base del abdomen hasta la parte superior del tórax hasta dejar visibles las vísceras. Para el lavado de la sangre de la arteria aorta se seccionó la aorta a nivel de la bifurcación ilíaca y se perfundieron entre 1 y 2 mL de PBS (tampón fosfato salino, *del inglés, Phosphate Buffered Saline*: 80g/L NaCl, 2g/L KCl, 2g/L KH₂PO₄, 21.6g/L Na₂HPO₄) mediante una aguja 23G introducida en el ápice del corazón. A continuación se extrajo el corazón y la aorta desde la inserción diafragmática y se eliminó la grasa adherida a la superficie externa de la pared arterial. Para los estudios de expresión génica el arco aórtico fue congelado rápidamente en N₂ líquido hasta su procesado. Para el análisis de la aterosclerosis *en face* de la aorta y el análisis histopatológico mediante inmunohistoquímica y tinciones el corazón y la aorta fueron fijados mediante perfusión de PFA al 4% (Paraformaldehyde, SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) a 4°C durante 17-19 horas. La obtención del páncreas se realizó tras lavado *in situ* y fue

fijado con PFA al 4% a 4°C durante 4 horas seguido de dos lavados de 10 minutos con PBS previos a la deshidratación.

Tras la fijación, el cayado aórtico y la aorta torácica descendente se sometieron a tinción por Oil Red para determinar la aterosclerosis (apartado 1.4.1) y el corazón, junto con la zona de inicio de la aorta torácica ascendente, se deshidrataron en una cadena de alcoholes de gradación creciente para su posterior inclusión en parafina como se indica a continuación: un lavado de 30 minutos con etanol al 50%, un lavado de 30 minutos con etanol al 70%, un lavado de 30 minutos con etanol al 80%, dos lavados de 30 minutos con etanol al 95%, dos lavados de 30 minutos con etanol absoluto y dos lavados de 15 minutos con xileno e inclusión en parafina. La anatomía de la aorta y de las distintas regiones analizadas se muestra en la **figura 29**.

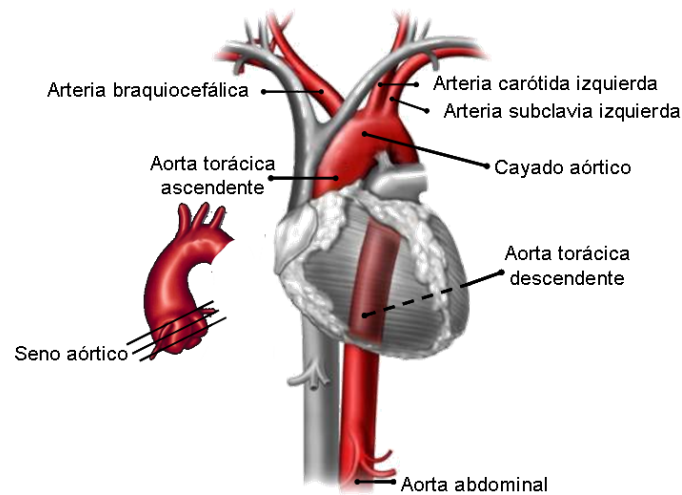


Figura 29. Anatomía de la arteria aorta. La arteria aorta nace en el ventrículo izquierdo y desde ahí se distinguen cinco regiones distintas: el seno aórtico o nacimiento de la aorta donde se encuentran las válvulas aórticas, la aorta torácica ascendente, el cayado aórtico, la aorta torácica descendente y la aorta abdominal. A la altura del cayado aórtico la arteria se ramifica en tres arterias menores denominadas braquiocefálica, carótida izquierda y subclavia izquierda.

La deshidratación del páncreas consistió en lavados secuenciales: un lavado de 15 minutos con etanol al 70%, un lavado de 15 minutos con etanol al 80%, un lavado de 15 minutos con etanol al 96%, tres lavados de 5 minutos con etanol absoluto, tres lavados de 5 minutos con etanol absoluto/xileno (50/50) y tres lavados de 5 minutos con xileno tras lo cual se incluyó en parafina.

1.4. Cuantificación de la aterosclerosis

1.4.1. Cuantificación del tamaño de la placa aterosclerótica *en face* en el cayado aórtico y en la aorta torácica

Para los ratones mantenidos con dieta control y con dieta aterogénica durante 3 meses, la extensión de la placa aterosclerótica en el cayado aórtico y en la aorta torácica descendente se determinó mediante montaje *en face* de la aorta y tinción con el colorante de lípidos Oil Red O (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU). Tras fijación con PFA 4%, la aorta se sometió a dos lavados de 5 minutos en metanol al 78% con agitación suave y se incubó durante 1 hora en una disolución de Oil Red O 0.02% (p/v), metanol 78% (v/v) y NaOH 0.3M seguido de dos nuevos lavados de 5 minutos en metanol al 78% para eliminar el exceso de colorante. Con el fin de exponer la superficie del lecho vascular con las placas de ateroma la aorta se abrió longitudinalmente bajo una lupa estereoscópica Zeiss Stemmi 2000-C (Axiolab, ZEISS, Göttingen, Alemania). La toma de imágenes de la arteria aorta teñida se realizó utilizando una cámara fotográfica CAMEDIA-C5060 (OLYMPUS, Barcelona, España) montada sobre dicha lupa estereoscópica. La cuantificación de la aterosclerosis se realizó determinando el porcentaje de la superficie del vaso cubierta con lesión aterosclerótica teñida con Oil Red O relativizada al área total de la aorta mediante morfometría computerizada utilizando la aplicación informática SigmaScan Pro 5.

1.4.2. Cuantificación de la aterosclerosis en el seno aórtico e inicio de aorta

El tamaño de la placa de ateroma se determinó en cortes transversales de 5µm de grosor del seno aórtico e inicio de aorta. Con este fin se desparafinaron e hidrataron los cortes sometidos a lavados secuenciales: tres lavados de 5 minutos con xileno, dos de 5 minutos con etanol absoluto, dos de 5 minutos con etanol al 95%, dos de 2 minutos con etanol al 70%, dos de 2 minutos con etanol al 50% y uno de 5 minutos con agua MilliQ.

Para determinar el tamaño de la neointima o lesión las secciones histológicas se tiñeron con hematoxilina-eosina cuantificándose tres secciones correspondientes a tres regiones del seno aórtico-inicio de aorta para cada ratón. La toma de imágenes de los cortes histológicos teñidos y montados con el reactivo Eukitt (A10500, DELTALAB, Barcelona, España), se realizó utilizando una cámara fotográfica CAMEDIA-C5060

(OLYMPUS, Barcelona, España) montada sobre un microscopio Zeiss Axiolab (Axiolab, ZEISS, Göttingen, Alemania).

1.5. Caracterización de la composición de la placa de ateroma

La caracterización del contenido de la placa de ateroma se basó en técnicas básicas de histología e inmunohistoquímica en cortes transversales hidratados como se indica en el apartado 1.4.2. Los anticuerpos y reactivos de histología empleados se indican en las **tablas 5 y 6**. Salvo que se indique lo contrario, todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente. Todas las incubaciones con anticuerpos o reactivos fueron seguidas de tres lavados de 5 minutos con PBS con el fin de eliminar el exceso de reactivo. La toma de imágenes de los cortes histológicos se realizó utilizando una cámara fotográfica CAMEDIA-C5060 montada sobre un microscopio Zeiss Axiolab. La cuantificación de los componentes de la placa de ateroma se realizó mediante la aplicación informática Metamorph (MOLECULAR DEVICES, Sunnyvale, CA, EEUU).

1.5.1. Cuantificación del contenido en macrófagos en la placa de ateroma

Para la detección de macrófagos en la placa aterosclerótica se realizó una inmunotinción empleando un anticuerpo comercial frente al antígeno específico de macrófagos Mac-3. Las secciones histológicas desparafinadas e hidratadas se sometieron a un bloqueo de la actividad peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 30 minutos seguido del bloqueo de interacciones no específicas durante 90 minutos utilizando una disolución de PBS-suero de cabra al 3%. La incubación con el anticuerpo primario anti-Mac-3 (diluido 1/200 en solución de bloqueo) se realizó a 4°C durante 15-17 horas seguido de lavados con PBS e incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado a biotina (diluido 1/300 en solución de bloqueo) durante 45 minutos. La detección del inmunocomplejo se realizó con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP, *del inglés, Horseradish Peroxidase*) durante 7 minutos seguido del revelado de la tinción con el cromógeno DAB (diaminobencidina), un compuesto que, en presencia de la enzima HRP, forma un precipitado marrón. Finalmente, se realizó una contratinción con hematoxilina de Harris para la detección de núcleos celulares y se procedió a la deshidratación de las muestras teñidas en una serie de alcoholes de

gradación creciente: un lavado de 2 minutos en etanol al 70%, un lavado de 2 minutos en etanol al 95%, un lavado de 2 minutos en etanol absoluto y un lavado de 2 minutos en xileno. Los cortes histológicos teñidos se montaron en medio comercial Eukitt. Tras la toma de imágenes y la cuantificación del contenido en macrófagos, el resultado se expresó como el porcentaje del área de la lesión positiva para Mac3 relativo al área de lesión.

1.5.2. Cuantificación del contenido en células de músculo liso vascular (cMLVs) en la placa de ateroma

Para la detección de cMLVs en la placa aterosclerótica se realizó una inmunotinción empleando un anticuerpo comercial frente a la SM- α -actina conjugado a fosfatasa alcalina. Tras la desparafinización e hidratación y el bloqueo de interacciones no específicas con PBS-suero de caballo al 5% durante 45 minutos, las secciones histológicas se incubaron a 4°C durante 15-17 horas con el anticuerpo anti-SM- α -actina (dilución 1/20 en solución de bloqueo). Se reveló empleando el sustrato comercial Fast Red (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) que produce un precipitado rosado-rojo al reaccionar con la fosfatasa alcalina y se procedió al montaje en glicerol gelatina (GG1, SIGMA, St. Louis, MI, EEUU). Tras la toma de imágenes se cuantificó el contenido en cMLVs y el resultado se expresó como el porcentaje del área de la lesión positiva para SM- α -actina relativa al área total de la lesión.

1.5.3. Cuantificación del contenido en colágeno en la placa de ateroma

Para la detección del colágeno en la placa de ateroma, se empleó la tinción tricrómica de Masson en la cual los núcleos de la célula se tiñen de negro con hematoxilina de Weigert, las fibras musculares se tiñen de rojo con fucsina y el colágeno se tiñe de verde con el colorante verde luz (**Tabla 4**).

Las secciones histológicas desparafinadas e hidratadas se sumergieron en una mezcla de disoluciones fresca durante 4 minutos que tiñe los núcleos. La mezcla de disoluciones consiste en una disolución A, hematoxilina de Weigert al 1% en etanol absoluto, madurada durante una semana en oscuridad y en una disolución B, 0.4% (v/v) de cloruro férrico al 30% y 0.1% (v/v) de ácido clorhídrico. Tras lavado de 10 minutos en agua corriente, se procedió a una incubación con fucsina al 0.1% y ácido

acético al 0.2% en agua destilada durante 15 segundos y dos lavados, uno con ácido fosfotúngstico al 10% durante 4 minutos seguido de 5 minutos en ácido acético al 10% en agua destilada. A continuación se procedió a una incubación en una solución de verde luz al 1% en agua destilada durante 1 minuto y a un último lavado en ácido acético al 10%. Se realizó una deshidratación rápida con alcoholes y xileno (30 segundos en etanol 70%, 30 segundos en etanol 95%, 30 segundos en etanol absoluto y 30 segundos en xileno) y al montaje de los cortes histológicos con Eukitt. Tras tomar las imágenes y cuantificar el contenido en colágeno el resultado se expresó como el porcentaje del área de la lesión positiva para verde luz.

Tabla 4. Reactivos empleados para la detección de colágeno según la tinción de Masson.

	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Hematoxilina de Weigert	PANREAC Barcelona, España	251344
Light Green SF Yellowfish	FISHER SCIENTIFIC Hampton, NH, EEUU	10675302
Acid Fuchsin calcium salt	SIGMA St. Louis, MI, EEUU	857408

1.6. Caracterización inmunohistológica del páncreas de ratón

Las inmunotinciones de páncreas se realizaron en cortes histológicos de 5µm de grosor recogiendo cortes consecutivos durante 80µm y descartándose las siguientes 80µm de tejido, obteniéndose de este modo un barrido completo del órgano. Para la desparafinación e hidratación los cortes se sometieron de forma secuencial a lavados de xileno y alcohol crecientes según se ha indicado para corazón seguido de un lavado final con agua MilliQ de 5 minutos. La caracterización del páncreas se basó en técnicas básicas de inmunohistoquímica. En las **tablas 5 y 6** se detallan todos los anticuerpos y reactivos empleados.

1.6.1. Cuantificación de islotes pancreáticos

Los islotes pancreáticos fueron identificados mediante inmunohistoquímica anti-insulina cuantificándose por cada páncreas 10-12 portas separados entre ellos 125µm.

Tras la desparafinización e hidratación del tejido se desenmascaró el antígeno con tampón citrato sódico 10mM, pH 6.5, se realizó un bloqueo de interacciones no específicas durante 60 minutos con suero de caballo al 5% en PBS y se incubaron las secciones histológicas a 4°C durante 15-17 horas con el anticuerpo anti-insulina (diluido 1/250 en solución de bloqueo). Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a biotina (dilución 1/300 en solución de bloqueo). Tras esto, se realizó una incubación durante 10 minutos con una dilución 1/2 en PBS de estreptavidina conjugada a HRP. Para el revelado de la tinción se empleó DAB. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Harris para la detección de núcleos celulares. La deshidratación se hizo en alcoholes de gradación creciente, el montaje con Eukitt y la toma de imágenes según lo indicado anteriormente. El análisis consistió en el conteo del número total de islotes y del área relativa de los islotes por área total de páncreas para cada ratón.

1.6.2. Cuantificación de la proliferación y de la apoptosis en islotes pancreáticos

La proliferación celular y la apoptosis fueron evaluadas en dos portas por ratón (con al menos 5 ratones por grupo experimental) mediante inmunohistoquímica frente a Ki67 como marcador de proliferación celular y frente a la forma procesada de la caspasa-3 (CL-caspasa 3) como marcador de apoptosis.

La desparafinización, hidratación del tejido y desenmascaramiento del antígeno se hicieron como se ha indicado para la inmunohistoquímica de insulina. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con una solución de peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol durante 5 minutos para Ki67 y en agua destilada durante 10 minutos para caspasa-3. Tras el bloqueo de las interacciones no específicas con PBS-suero de caballo al 5% durante 30 minutos las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios, el anticuerpo anti-Ki67 prediluido y el anticuerpo anti-forma CL-caspasa 3 (dilución 1/200) a 4°C entre 15-17 horas. Tras tres lavados en PBS de 5 minutos las secciones fueron incubadas durante 30 minutos con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a biotina (diluido 1/500) seguido de 10 minutos con una dilución 1/2 en PBS de estreptavidina conjugada a HRP (dilución 1/2) y revelado con el

sustrato DAB. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se hidrataron y se montaron con Eukitt como anteriormente. La proliferación se determinó como el porcentaje de células positivas para Ki67 con respecto al número total de células del islote mientras que la apoptosis se expresó como el porcentaje del área positiva para CL-caspasa-3 con respecto al área total del islote.

1.6.3. Cuantificación de p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} en islotes pancreáticos

La detección de p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} en islotes pancreáticos se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica en ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 1 año de edad evaluándose 10 islotes por ratón con 8 ratones por grupo experimental.

Tras la desparafinización e hidratación del tejido, se realizó un bloqueo de interacciones no específicas durante 60 minutos con suero de caballo al 5% en PBS y se incubaron las secciones histológicas a 4°C durante 15-17 horas con el respectivo anticuerpo (diluido 1/100 en solución de bloqueo). Transcurrido este tiempo, las secciones se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a biotina (dilución 1/300 en solución de bloqueo para p15^{INK4b} y p19^{ARF} y dilución 1/100 para p16^{INK4a}). Tras 10 minutos de incubación con estreptavidina conjugada a HRP (1/2 en PBS), las secciones se revelaron con DAB, se contratiñeron con hematoxilina y montaron con EUKITT según descrito anteriormente. El análisis consistió en el recuento del número de células positivas para p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} relativizado al área total del islote.

Tabla 5. Anticuerpos primarios empleados en técnicas de inmunohistoquímica.

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-Mac-3 (LAMP-2)	Monoclonal de rata	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-19991
Anti-SM α -actina (fosfatasa alcalina)	Monoclonal de ratón	SIGMA St. Louis, MI, EEUU	a5691
Anti-insulin	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc9168
Anti-Ki67 prediluido	Monoclonal de conejo	MÁSTER DIAGNOSTICA Granada, España	MAD-000310QD
anti-cleaved-caspase-3	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING Boston, MA, EEUU	9661
anti-p15 ^{INK4b}	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING Boston, MA, EEUU	4822
anti-p16 ^{INKa}	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-1207
anti-p19 ^{ARF}	Monoclonal de rata	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-32748

Tabla 6. Anticuerpos secundarios y reactivos químicos empleados en técnicas de inmunohistoquímica.

		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
goat anti-rat IgG biotinilado	Anti-rata Producido en cabra	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-2041
goat anti-rabbit IgG biotinilado	Anti-conejo Producido en cabra	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-2040
Streptavidina-HRP		LABVISION CORPORATION Thermofisher, Fremont, CA EEUU	TS-060-HR
DAB		AbD SEROTEC Oxford, Reino Unido	BUF021A
Fast Red		SIGMA St. Louis, MI, EEUU	F-4648
Hematoxilina de Harris		SIGMA St. Louis, MI, EEUU	HHS32

1.7. Aislamiento de islotes pancreáticos

Para el aislamiento de islotes pancreáticos los ratones se dislocaron cervicalmente y el páncreas se perfundieron *in situ* con una solución de Krebs frío (NaCl 127mM, KCl 4.8mM, CaCl₂ 2.6mM, MgCl₂ 1.23mM, NaHCO₃ 23.99mM, Hepes 6.3mM, glucosa 1.8mg/mL, 0.1% albumina, equilibrado con 5% CO₂ en O₂). Posteriormente, tras la extracción del órgano, se troceó y se retiró la grasa flotante realizándose una digestión en solución de Krebs con colagenasa NB 8 (1mg/mL, 17456, SERVA GmbH, Heidelberg, Alemania) en baño a 37°C con agitación manual durante 20-30 minutos. El homogeneizado obtenido fue lavado con Krebs frío y centrifugado (800g, 1min)

repetiendo esta operación tres veces. Los islotes fueron aislados a mano bajo lupa estereoscópica, recogidos mediante centrifugación (500g, 1 min) para eliminar el exceso de Krebs, congelados en N₂ líquido y conservados a -80°C hasta la posterior extracción y análisis de ARN y proteínas como se indica en los apartados correspondientes.

1.8. Experimentos de señalización de insulina

Para los experimentos *in vivo* de señalización de insulina, los ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 1 año de edad se ayunaron 15 horas y se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal con 6µL/g de peso corporal de una mezcla que contiene un 60% de clorhidrato de ketamina (Imalgene, Merial, Toulouse, Francia) y un 40% de medetomidina clorhidrato (Domtor, Orion Corporation, Espoo, Finlandia). Tras la apertura del animal longitudinalmente desde la base del abdomen hasta la parte superior del tórax se inyectó, a través de la vena hepática, 0.25U de insulina por gramo de peso corporal (Humulina Regular, Lilly Indianápolis, Indiana, EE.UU). A los 5 minutos de la administración de la insulina se sacrificaron los animales y se extrajo el hígado, el músculo esquelético y el corazón que fueron congelados rápidamente en N₂ líquido y guardados a -80°C para la posterior extracción de proteína y análisis como se indica en los apartados correspondientes. Los ratones control *WT* y *Super-Ink4/Arf* de la misma edad no estimulados fueron sacrificados utilizando el mismo procedimiento.

1.9. Experimentos de captación de glucosa de músculo sóleo mediante PET-CT

Para el estudio *in vivo* de la captación de glucosa se utilizó la técnica de PET (tomografía por emisión de positrones, *del inglés, Positron Emission Tomography*) combinada con tomografía computerizada (CT, *del inglés Computed Tomography*). El uso de sistemas híbridos PET-CT proporciona información cualitativa de imágenes clínicas y permite cuantificar la captación de trazadores emisores de positrones en relación a diferentes procesos metabólicos mediante imágenes tomográficas.

Para el seguimiento de la captación de glucosa se utiliza una forma no metabolizable de la glucosa, deoxyglucosa, marcada radioactivamente con el trazador ¹⁸F-FDG (¹⁸F-Fluorodeoxyglucose) y se sigue su acumulación en el tejido de interés para la determinación de la actividad metabólica. Para investigar la captación de

glucosa en los ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* se inyectaron intraperitonealmente 11,1 MBq (300 de μCi en 0.2 mL NaCl 0.9%) del marcador ^{18}F -FDG. Tras 60 minutos de captación los ratones fueron anestesiados con isoflurano 2% para asegurar la inmovilización durante el proceso de escaneo y tomografía. La adquisición PET duró 20 minutos y fue seguida de una tomografía computerizada en un tomógrafo híbrido PET-CT específico para pequeños animales (ALBIRA ARS, Oncovision, Valencia, España) con una resolución de imagen de <1.5 mm (Balcerzyk M et al., 2009). Las imágenes tomográficas se reconstruyeron mediante la aplicación del algoritmo OSEM (*del inglés, Ordered Subset Expectation Maximization*) para el PET y una retroproyección filtrada (FBP, *del inglés, Filtered Back Projection*) de las imágenes de CT. Para evaluar la captación de ^{18}F -FDG en el músculo esquelético, el volumen de interés (VOI, *del inglés, Volume of Interest*) fue delineado alrededor del músculo sóleo, y consistió en 8 elipses apiladas de 0.0125mm de grosor. El VOI fue transferido al PET-CT para obtener la actividad media de captación de ^{18}F -FDG (kBq/cc). Para la cuantificación, el valor de captación estándar (SUV, *del inglés, Standard Uptake Value*) se calculó como la ratio de la concentración de radiactividad del tejido (kBq/cc) al inicio de la adquisición del PET y la inyección de la dosis (KBq) dividido por el peso corporal (g).

$$\text{SUV} = \frac{\text{Concentración actividad en el tejido}}{\text{Actividad inyectada/peso corporal}}$$

Todos los procesos de visualización, registro y cuantificación se realizaron usando el PMOD 3.0 suite (PMOD TECHNOLOGIES, Zurich, Suiza). Los estudios de PET-CT se realizaron en el servicio de cartografía cerebral del CAI, del Instituto pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid.

2. ESTUDIOS *IN VITRO* EN CULTIVOS CELULARES

2.1. Obtención de cultivos primarios de ratón y de rata

La manipulación de cultivos celulares se realizó en campana de flujo laminar de bioseguridad nivel 1I-A. El crecimiento de las líneas celulares se llevó a cabo en condiciones constantes de temperatura (37°C) y de concentración de CO₂ (5%). Los medios de cultivos y sus aditivos se adquirieron de Cambrex (LONZA BIOSCIENCE, Walkersville, MD, EEUU). En general las células se cultivaron en medios con presencia de penicilina (100U/mL) y estreptomicina (0.1mg/mL) (indicado como PS).

2.1.1. Obtención de macrófagos derivados de médula ósea de ratón

Los macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) son macrófagos obtenidos a partir de precursores de médula ósea diferenciados *in vitro* en presencia de MCSF (*del inglés, Macrophage Colony Stimulating Factor*) como factor de crecimiento y diferenciación. Para su obtención se extrajo médula ósea del fémur y de la tibia y se disgregó mecánicamente mediante dos pases a través de una aguja 19G. La suspensión celular obtenida se sembró en placas de cultivo estándar en medio de cultivo DMEM/PS, 10%FBS y 10% de medio condicionado de células L929 (*LCM, del inglés L929-cell conditioned medium*) como fuente de MCSF. Los progenitores de médula ósea se plaquearon a una concentración de 3×10^6 células/mL y se cultivaron durante 7 días con cambios de medio al tercer y al sexto día (Sanz-Gonzalez et al., 2007). El medio LCM se obtuvo del sobrenadante de células L-929 mantenidas en confluencia durante 5-7 días.

2.1.2. Obtención de cMLVs de ratón y de rata

Los cultivos de cMLVs de ratón se obtuvieron a partir de entre 5-7 aortas torácicas sometidas a dos digestiones consecutivas (Sanz-Gonzalez et al., 2007). Tras la eliminación de la grasa adherida a la pared externa de la arteria, se realizó una primera digestión enzimática con colagenasa tipo II 175U/mL (WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION, Freehold, NJ, EEUU) a 37°C durante 20 minutos en tampón HBSS/PS/anfotericina y CaCl₂ (HBSS completo) que permitió la eliminación de

la capa adventicia. A continuación se abrió longitudinalmente el vaso y se procedió al raspado del endotelio cortándose la arteria en fragmentos de tamaño reducido que se incubaron a 37°C a lo largo de la noche en medio DMEM/PS/anfotericina/FBS 20%. La segunda digestión se realizó en HBSS completo con 175U/mL de colagenasa tipo II y 4.7U/mL de elastasa (Elastase from hog pancreas, 45124, SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) durante 20 minutos dando lugar a una suspensión celular que se sembró en medio DMEM/PS/FBS20%. La pureza del cultivo de cMLVs se confirmó mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal anti-SM α -actina como se indica en el apartado 1.5.2.

Las cMLVs de rata se obtuvieron de la aorta torácica descendente (Verdeguer et al., 2007). Tras la eliminación de la grasa adherida a la pared externa de la aorta torácica se eliminó la capa adventicia bajo estereoscopio. Seguidamente se eliminó la capa de endotelio mediante raspado y se fragmentó la aorta para proceder a una única digestión con colagenasa (175U/mL, Worthington Biochemical Corp.) y elastasa tipo 2 (Elastase from hog pancreas, 45124, SIGMA). La suspensión celular obtenida, tras centrifugación a 1200rpm durante 6 minutos, se sembró en medio DMEM/PS/anfotericina/FBS 20%. La pureza del cultivo de cMLVs se confirmó como anteriormente.

2.2. Ensayos funcionales *in vitro*

2.2.1. Estudios de captación de LDL acetiladas

Los estudios *in vitro* de captación de LDLmo se realizaron en MDMO de ratones *apoE*^{-/-} (n=3) y de ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} (n=3). Para la captación los macrófagos se incubaron durante 4 horas con LDLac conjugadas al fluoróforo Alexa Fluor 488 (acLDL, 1 μ g/ml, INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU) en medio libre de suero. Tras la incubación las células fueron recuperadas tras tripsinización, lavado con PBS y centrifugación (400g, 5 minutos). La captación de Alexa Fluor 488-acLDL se cuantificó mediante citometría de flujo analizando la intensidad media fluorescente (unidades arbitrarias) usando un citómetro FACsCanto (BD BIOSCIENCE Franklin Lakes, NJ, EEUU).

2.2.2. Análisis de la apoptosis

La apoptosis en cultivos celulares se determinó mediante citometría de flujo en células teñidas con ioduro de propidio (50 µg/mL, P4170, S1GMA, St. Louis, MI, EEUU). Para inducir la apoptosis los MDMO fueron tratados con luz ultravioleta (UV: 80 J/m²) y tras 24 horas en cultivo se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se recogieron por centrifugación (400g, 5 minutos). Las células se fijaron con etanol 80% durante 30 minutos a -20°C y se incubaron con ioduro de propidio en presencia de ARNasa A (0.25 mg/mL, R4642, S1GMA, St. Louis, MI, EEUU) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células hipodiploides apoptóticas fueron identificadas como la población Sub-G0 en análisis de ciclo celular mediante citómetro de flujo FACSCanto (BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU).

2.3. Estudios de inhibición en cMLVs de rata

Para los estudios de inhibición farmacológica de las quinasas, las cMLVs de rata se incubaron durante 15 horas con el inhibidor de MEK U0126 (10µM, PROMEGA, Madison, WI, EEUU) o con el inhibidor de Akt VIII (1µM, CALBIOCHEM, Nottingham, Reino Unido). Para ver el efecto de los inhibidores en el efector de la vía ERK/c-Fos las células fueron ayunadas 48 horas, incubadas 1 hora con o sin el inhibidor de MEK U0126 y estimuladas con suero 2 horas. Tras los tratamientos, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se recogieron por centrifugación (400g, 5 minutos). El efecto de los tratamientos se analizó mediante Western Blot y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Los anticuerpos y los cebadores utilizados para el análisis del efecto de la inhibición mediante Western Blot y mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR, *del inglés, Quantitative Polymerase Chain Reaction*) se muestran en las **tablas 7 y 8** y **tabla 9C**, respectivamente (Fw, Forward. Rv, Reverse).

3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

3.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos

Para el análisis de la señalización a través de insulina, los extractos proteicos de los tejidos fueron obtenidos por homogeneización utilizando 100µl de tampón de lisis TNG (Tris-HCl 50mM, pH 7.5, NaCl 200mM, Tween-20 1%, NP-40 0.2%) suplementado con Complete Mini cocktail (ROCHE, Mannheim, Alemania), β-glicerolphosphate 50mM (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU), 2mM PhenylMethylSulfonyl Fluorid (PMSF, ROCHE, Mannheim, Alemania) y Na₃VO 200µM (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) por cada 50mg de órgano. Las suspensiones obtenidas se sometieron a tres pulsos de 30 segundos de homogeneización en un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA WERKE GMBH&Co., Staufen, Alemania). Todos los homogeneizados se sometieron a tres ciclos de congelación con N₂ líquido, descongelación en baño a 37°C y agitación durante 30 segundos. Los extractos proteicos de cMLVs y de tejidos para análisis de las proteínas p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} se obtuvieron mediante ciclos de congelación con N₂ líquido, descongelación en baño a 37°C y agitación durante 30 segundos en presencia de tampón Tris-HCl 50mM, pH 7.5, 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 1mM DTT e inhibidores de fosfatasas y proteasas (protease inhibitor Complete mini Cocktail, ROCHE, Mannheim, Alemania). Por último, se centrifugaron las muestras a 12000g durante 30 minutos a 4°C para eliminar las membranas no disueltas y el sobrenadante se congeló para su posterior análisis

La cuantificación de los extractos proteicos obtenidos se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Esta técnica consiste en la medición del cambio en el espectro visible del colorante Coomassie Blue G-250 tras su unión con proteínas. Esta unión provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465nm a 595nm. Se siguieron las instrucciones de la casa comercial (BIO-RAD, Munich, Alemania) y se realizó una curva patrón con disoluciones de concentraciones conocidas de γ-globulina en un rango de entre 0.25 y 2µg/µL en la que se interpolaron los valores de absorbancia a 595nm de las muestras a cuantificar.

3.2. Experimentos de co-inmunoprecipitación

Para los experimentos de co-inmunoprecipitación, 500µg de extracto proteico, fueron incubados durante 1 hora en agitación orbital a 4°C con 2µg/mL del anticuerpo policlonal de conejo anti-IRS1 o policlonal de conejo anti-IRS2 en un volumen total de 500µL de tampón TNG suplementado con inhibidores seguido de una segunda incubación, 1 hora a 4°C con 30 µL de Protein A/G PLUS-Agarose al 50% en PBS. Los inmunocomplejos fueron lavados (centrifugando entre los lavados durante 5 segundos a 16000g y a 4°C) con tampón TNG para la inmunoprecipitación de IRS1 o con tampón CLB (TrisHCl 2.5mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM y Triton X-100 1%) para la inmunoprecipitación de IRS2 y recuperados para su análisis posterior. Las proteínas se eluyeron mediante ebullición con 30µL de tampón laemmli (tampón de carga con SDS y β-mercaptoetanol) y fueron sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida según se indica en la siguiente sección. Los anticuerpos usados se detallan en las **tablas 7 y 8**.

3.3. Análisis de la expresión proteica mediante SDS-PAGE y Western Blot

El análisis de las proteínas presentes en los distintos extractos proteicos se detectó mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (*del inglés, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), Western Blot e inmunodetección de las proteínas, de acuerdo con lo descrito en "Current Protocols in Protein Science" (Palmer and Wingfield, 2004) utilizando los anticuerpos primarios y secundarios descritos en las **tablas 7 y 8**.

La electroforesis SDS-PAGE permite separar las proteínas en función de su peso molecular (Laemmli, 1970). Previamente a su carga en el gel, los extractos proteicos se diluyeron en agua milliQ y laemmli y se calentaron a 95°C durante 5 minutos con el fin de desnaturizar las proteínas y hacer constante su relación carga/masa. De esta forma se logró una separación exclusivamente dependiente del tamaño. Se empleó un sistema vertical de electroforesis discontinua con un gel superior de concentración de las bandas con una concentración de poliacrilamida del 4% y uno inferior de resolución que fue variable según el tamaño de las proteínas analizadas: para la detección de pTyr, IRS1, IRS2 y p85α en los experimentos de señalización de la insulina se emplearon geles del 8%, para la separación de las proteínas p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} se utilizaron geles del 15% y para la separación del resto de proteínas la electroforesis

se realizó en geles al 12%. La electroforesis se llevó a cabo en un tampón compuesto por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS durante 1 hora y 30 minutos a un voltaje variable entre 80 y 120V. La transferencia de las proteínas desde el gel de acrilamida a la membrana de PVDF (Western Blot) se realizó con un sistema MiniProtean (BIO-RAD LABORATORIES, Hercules, CA, EEUU) en frío durante 90 minutos a 100V constantes y en un tampón compuesto por 25mM Tris, 192mM glicina y 20% metanol (pH 8.3). Tras la transferencia, las membranas se incubaron en solución de bloqueo consistente en 4% de leche desnatada en TPBS (Tween-20 PBS: PBS, 0.05% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. La incubación con los anticuerpos primarios específicos se realizó en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Tras tres lavados de 5 minutos con TPBS para eliminar los restos de anticuerpo primario, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a HRP. La detección de las bandas proteicas se realizó mediante quimioluminiscencia ECL-Plus y empleando el sistema de adquisición y análisis de imagen Fujifilm LAS-3000.

Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante Western Blot.

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-ERK2	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz. CA. EEUU	sc-154
Anti-fosfo-ERK1/2	Monoclonal de ratón	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz. CA. EEUU	sc-7383
Anti-c-Fos	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz. CA. EEUU	sc-52
Anti-Akt1/2	Policlonal de cabra	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz. CA. EEUU	sc-1619
Anti-fosfo-Akt (ser473)	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING TECHNOLOGY Boston. MA. EEUU	9271
Anti-fosfo-p70 ^{S6K}	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING TECHNOLOGY Boston. MA. EEUU	9208
Anti-IRS1	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz. CA. EEUU	sc-559
Anti-IRS2	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz. CA. EEUU	sc-8299
Anti-p85 α	Policlonal de conejo	MILLIPORE Madrid. España	06-195
Anti-phospho-Tyr	Monoclonal de ratón	MILLIPORE Madrid. España	05-321
anti- β -actin	Monoclonal de ratón	SIGMA St. Louis. MI. EEUU	A5441
Anti-IRS1	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING Boston. MA. EEUU	2382
Anti-IRS2	Monoclonal de ratón	MILLIPORE Madrid. España	06-506
Anti-SAPK/JNK (56G8)	Monoclonal de conejo	CELL SIGNALING Boston. MA. EEUU	9258
Anti-phospho-SAPK/JNK	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING Boston. MA. EEUU	2994
Anti-p16 ^{INK4a}	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz. CA. EEUU	sc-1207
Anti-p19 ^{AKT}	Monoclonal de rata	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz. CA. EEUU	sc-32748
Anti-p15 ^{INK4b}	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING Boston. MA. EEUU	4822

Tabla 8. Anticuerpos secundarios y reactivos empleados para la detección de proteínas mediante Western Blot.

		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
goat anti-mouse IgG-HRP	Anti-ratón Producido en cabra	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-2005
goat anti-rabbit IgG-HRP	Anti-conejo Producido en cabra	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-2004
donkey anti-goat IgG-HRP	Anti-cabra Producido en burro	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-2056
goat anti-mouse IgG-HRP	Anti-ratón Producido en cabra	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-2031
Protein A/G PLUS-Agarose		SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-2003
ECL Plus Western Blotting Detection System		GE HEALTHCARE Piscataway, NJ, EEUU	RPN2132

4. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)

4.1. Obtención y cuantificación de extractos de ARN

Para la extracción de ARN de células en cultivo de ratón y de rata, de tejido aórtico de ratones *apoE*^{-/-} vs *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta aterogénica y de hígado, músculo esquelético, corazón e islotes (75-100 islotes por extracto) de ratones *Super-Ink4/Arf* y *WT* se utilizó el reactivo TRIzol (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células en cultivo se recogieron mediante raspado de placas de 10cm² en presencia de 1mL TRIzol. Para la extracción de ARN de tejidos se añadió 1mL TRIzol por cada 50-10mg de tejido, de tejido aórtico (dos arcos aórticos por muestra) y se homogeneizó en un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA WERKE GMBH&Co., Staufen, Alemania). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadió cloroformo (200µL) y se procedió a la separación de las fases mediante centrifugación (12000g, 15 minutos, 4°C). El ARN se precipitó de la fase acuosa con iso propanol (10 minutos) realizándose un lavado del ARN precipitado con etanol al 75%. Tras secado del precipitado, el ARN se resuspendió en ADNasa/ARNasa free water (AMBION, Carlsbad, CA, EEUU) a 55°C durante 10 minutos y se cuantificó en un Nanodrop (THERMO SCIENTIFIC, Waltham, MA, EEUU) mediante medida espectrofotométrica a 260nm de longitud de onda. La pureza se estimó en base a la relación $A_{260/280}$, siendo ésta superior a 1.8 en todos los extractos analizados. El extracto de ARN obtenido se almacenó a -80°C hasta su análisis. En todo momento, a lo largo del protocolo de extracción de ARN, se emplearon reactivos y tubos libres de ARNasas.

4.2. Retrotranscripción del ARN y análisis de la expresión génica por qPCR

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del extracto de ARN total, entre 0.5-1µg de los tejidos de los ratones y de los cultivos celulares se retrotranscribieron usando el kit comercial "Superscript III First Strand Synthesis Supermix" (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo el protocolo indicado. Para el análisis de la expresión génica por qPCR se utilizó el kit "Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG with Rox dye" (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU) y se usó un

termociclador ABI 7900 FAST (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, EEUU). Los cebadores utilizados fueron diseñados mediante el programa Primer Express (APPLIED BIOSYSTEM, Foster City, CA, EEUU) y se muestran en la **Tabla 9**. Los resultados fueron analizados con la aplicación informática suministrada por el fabricante (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, EEUU) empleando el método del $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001). Para los diferentes genes, los niveles de ARNm se normalizaron respecto al control endógeno de ciclofilina en el caso de los ratones y de los cultivos de MDMO y de cMLVs de ratón y respecto al enzima Gapdh en el caso de las cMLVs de rata. La expresión de los genes se relativizó a las condiciones controles (RQ=1) o a los ratones control (RQ=1) en cada experimento.

Tabla 9. Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica mediante qPCR. (A) Cebadores usados para el análisis de la expresión génica en ratones *apoE*^{-/-} vs *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}. **(B)** Para ratones *WT* vs *Super-Ink4/Arf* de 1 año de edad. **(C)** Para cMLVs de rata en estudios de inhibición farmacológica de quinasas. Los niveles de ARNm en ratón se normalizaron respecto al control endógeno ciclofilina y en rata respecto a *Gapdh* (Fw, Forward. Rv, Reverse).

RATÓN		RATA
A	B	C
CD36 Fw 5'-TCGGAAGTGTGGGCTCATTG-3' Rv 5'-CCTCGGGGTCCTGAGTTATATTTTC-3' Sra Fw 5'-CATGAACGAGAGGATGCTGACT-3' Rv 5'-GGAAGGGATGCTGTCATTGAA-3' Mcp1 Fw 5'-GCCCAGCACCCAGCACCCAG-3' Rv 5'-GGCATCACAGTCCGAGTC-3'	Irs1 Fw 5'-CGGAGAGCGATGGCTTCTC-3' Rv 5'-GTTTGTGTCATGCTCTGGGTTT-3' Irs2 Fw 5'-CGGTCGACTGCTGTCTGAAC-3' Rv 5'-GAGGGCGATCAGGTAAGTGTG-3' p15^{INK4b} Fw 5'-AGATCCCAACGCCCTGAAC-3' Rv 5'-CCCATCATCATGACCTGGATT-3' p16^{INK4a} Fw 5'-CGTACCCCGATTGAGGTGAT-3' Rv 5'-TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT-3' p19^{ARF} Fw 5'-TCTTGAGAAGAGGGCCGCACC-3' Rv 5'-GAATCTGCACCCTAGTTGAGC-3'	Mcp1 Fw 5'-GCTGCTACTCATTCACTGGCAA-3' Rv 5'-TGCTGCTGGTGATTCTCTTGTGA-3' Gapdh Fw 5'-TGCACCACCAACTGCTTA-3' Rv 5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3'
Ciclofilina Fw 5'-TGGAGAGCACCAAGACAGACA-3' Rv 5'-TGCCGGAGTCGACAATGAT-3'		

Para el análisis en el cayado de la aorta de genes relacionados con las vías de señalización por insulina en ratones *apoE*^{-/-} vs *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta aterogénica durante dos meses se utilizó el Superarray “Mouse Insulin Signaling Pathway RT2 Profiler PCR Array System” (Superarray BIOSCIENCE Cat. # PAMM-030) que permite analizar 84 genes relacionados con la vía de señalización de la insulina y genes endógenos utilizados para la normalización. Para cada array el ARN se extrajo con TRIzol de un pool de dos arcos aórticos y el ADNc fue sintetizado usando el kit “Reaction-Ready First Strand cDNA synthesis” (Superarray, BIOSCIENCE, San José, CA, EEUU). Para cada genotipo se hicieron cinco arrays (qPCR) independientes usando el termociclador 7500 Fast System Light Cycle y

analizando los datos según las recomendaciones dadas por el fabricante (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, EEUU). La expresión en los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* fue relativizada con respecto a los ratones *apoE^{-/-}* (=1).

5. ESTUDIOS EN PACIENTES

5.1. Características clínicas de los pacientes

En cumplimiento con las directrices institucionales, los sujetos fueron informados del presente estudio y todos se mostraron conformes en participar. El estudio se llevó a cabo en conformidad con la Declaración de Helsinki y el Comité de Ética de la Universidad Clínica de Navarra aprobó el protocolo. El estudio se realizó con muestras de 55 individuos no relacionados que habían sido mantenidos en ayuno 12 horas durante la noche. Los exámenes clínicos se basaron en los antecedentes médicos, en el examen físico y en las pruebas rutinarias de análisis. Los criterios que fueron adoptados para el diagnóstico de SM de los sujetos fueron los que se muestran en la **tabla 10**.

Tabla 10. Criterios diagnósticos para el SM de los pacientes incluidos en el estudio. Los criterios adoptados para clasificar a los pacientes se basaron en los propuestos por el “*Program Adult Treatment Panel III (ATP III)*” (Grundy et al., 2005) e incluyen la determinación de los valores de la circunferencia de la cintura, de los valores de triglicéridos, del colesterol HDL, de la glucosa en ayunas y de la presión arterial.

Obesidad: circunferencia de la cintura	≥ 102cm en hombres ≥ 88cm en mujeres
Hipertrigliceridemia: triglicéridos	≥ 1,7 mmol/l o el uso de medicamentos para reducir los niveles
Bajos niveles de colesterol HDL	< 1,03 mmol/l en el caso de los hombres < 1,3 mmol/l en las mujeres o el uso de medicamentos para aumentar el colesterol HDL
Alta presión arterial	presión arterial sistólica (PAS) ≥ 130mmHg presión arterial diastólica (PAD) ≥85mmHg o uso de medicación antihipertensiva
Niveles altos de glucosa en ayunas	glucosa ≥ 5,55 mmol/l o el uso de medicamentos para reducir los niveles

La RI se diagnostica cuando el índice HOMA (*del inglés, Homeostasis Model Assessment*: niveles de glucosa en ayunas (mmol/L) x niveles de insulina en ayunas ($\mu\text{U/mL}$) / 22.5) es igual o superior a la media en sujetos con peso normal más 2.5 desviaciones estándar (HOMA ≥ 3.3). Usando este criterio se identificaron 28 pacientes con RI y 25 pacientes sensibles a insulina en la población estudiada.

5.2. Obtención y análisis de la expresión génica en células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)

El aislamiento de CMSPs y la obtención de ARN se llevaron a cabo en el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra en colaboración con el grupo del Dr. Guillermo Zalba.

Para el análisis de la expresión génica por qPCR, 500ng de ARN fueron retrotranscritos mediante el kit comercial “Superscript III First Strand Synthesis Supermix” (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU). La amplificación en tiempo real se realizó mediante el empleo del kit “Platinum Quantitative PCR Supermix-UDG con Rox dye” (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU). Las reacciones se realizaron en un termociclador 7500 Fast System (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, EEUU) y los resultados fueron analizados con el software suministrado por el fabricante (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU). Los cebadores utilizados fueron diseñados como se indica anteriormente y se detallan en la **tabla 11** (Fw, Forward. Rv, Reverse). Los resultados de la PCR en tiempo real fueron analizados como indicado anteriormente y los niveles de ARNm se normalizaron respecto al control endógeno *Gapdh* y se relativizaron a los pacientes sensibles a la insulina.

Tabla 11. Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica por qPCR en CMSPs de pacientes. El análisis se llevó a cabo en CMSPs de pacientes con SM resistentes y sensibles a insulina. Los niveles de ARNm se normalizaron respecto al control endógeno Gapdh. (Fw, Forward. Rv, Reverse).

<p>Irs1 Fw 5'-CGGAGAGCGATGGCTTCTC-3' Rv 5'-GTTTGTGCATGCTCTTGGGTTT-3'</p>
<p>Irs2 Fw 5'-CCGACGCCAAGCACAAGTA-3' Rv 5'-CGGCCACGGCGAAGTA-3'</p>
<p>Akt1 Fw 5'-CCGACGCCAAGCACAAGTA-3' Rv 5'-CGGCCACGGCGAAGTA-3'</p>
<p>Akt2 Fw 5'-CAAGGATGAAGTCGCTCACACA-3' Rv 5'-GAACGGGTGCCTGGTGTTC-3'</p>
<p>Akt3 Fw 5'-CCTTGAAATATTCCTTCCAGACAAA-3' Rv 5'-ACAGCTCGCCCCATTAAC-3'</p>
<p>Gapdh Fw 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' Rv 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'</p>

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En los experimentos con dos grupos, la existencia de diferencias estadísticamente significativas se evaluó mediante el test t-Student no pareado de dos colas (Software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EEUU) y se representó como la media \pm error estándar de la media. En el resto de casos, se empleó un análisis de varianza unidireccional (test one-way ANOVA) (Statview, SAS institute, Cary, EEUU). Para calcular las diferencias en las características clínicas y demográficas entre los pacientes resistentes y sensibles a la insulina se utilizó el test t-Student o el test Mann-Whitney's U. El análisis χ^2 se usó para analizar diferencias entre las variables cualitativas. El test Pearson se utilizó para evaluar las asociaciones entre las variables continuas en estudios en pacientes. El análisis multivariado de regresión lineal se realizó para evaluar los factores relacionados con la expresión humana de *Irs2* y *Akt2*. El test de Grubbs se empleó para la determinación y eliminación de valores atípicos. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas para valores $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Estudio de los efectos de la disminución en la ruta de señalización por insulina mediados por IRS2

1.1. Análisis de la señalización de *Irs2* en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con SM con y sin resistencia a insulina

1.1.1. La RI en pacientes con SM se asocia con la presencia de factores de riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares

Los pacientes utilizados en el estudio mostraron SM y fueron clasificados como sensibles o resistentes a la insulina (SM-SI y SM-RI, respectivamente) según el índice HOMA (ver materiales y métodos). En la **tabla 12** se indican las características demográficas y clínicas de los pacientes.

Tabla 12. Parámetros bioquímicos y antropométricos de los pacientes con SM sensibles (SM-SI) y resistentes a insulina (SM-RI). Los pacientes SM-RI presentaron aumentados el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia de la cintura, la presión arterial diastólica (PAD), el índice HOMA, los niveles plasmáticos de insulina, LDLox y MMP-9. Por el contrario, mostraron niveles más bajos de c-HDL en plasma en comparación con los pacientes SM-SI. (Los datos se muestran como el promedio \pm desviación estándar).

	Sensibles a insulina	Resistentes a insulina	p-valor
Género (hombre/mujer)	22/3	26/4	0.797
Edad (años)	55 \pm 2	52 \pm 2	0.154
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	28.4 \pm 1.2	32.3 \pm 0.9	0.012
Circunferencia de la cintura (cm)	98 \pm 2	106 \pm 2	0.021
Presión arterial sistólica (mmHg)	137 \pm 3	140 \pm 3	0.593
Presión arterial diastólica (mmHg)	80 \pm 2	88 \pm 2	0.032
Glucosa (mmol/L)	101 \pm 2	106 \pm 3	0.152
Insulina (pmol/L)	59.4 \pm 4.8	123.6 \pm 7.2	<0.001
Índice HOMA	2.3 \pm 0.2	5.4 \pm 0.4	<0.001
Colesterol total (mg/dL)	216 \pm 13	226 \pm 11	0.945
Colesterol LDL (mg/dL)	146 \pm 13	150 \pm 9	0.938
Colesterol HDL (mg/dL)	41 \pm 2	36 \pm 1	0.037
Triglicéridos (mg/dL)	153 \pm 16	154 \pm 12	0.938
Factor de von Willebrand (%)	115 \pm 13	116 \pm 7	0.924
Fibrinógeno (mg/dL)	287 \pm 12	288 \pm 13	0.984
Proteína C-reactiva (mg/dL)	0.31 \pm 0.04	0.27 \pm 0.03	0.339
LDL oxidadas (U/L)	69 \pm 4	86 \pm 5	0.017
MMP-9 (ng/mL)	9.9 \pm 1.2	14.0 \pm 1.4	0.038
Obesidad (%)	48	77	0.028
Diabetes (%)	12	17	0.625
Dislipidemia (%)	84	97	0.104
Hipertensión (%)	72	77	0.692
Medicación			
Antihipertensivos (%)	40	47	0.713
Estatinas (%)	8	7	1.000
Hipoglicémicos orales (%)	12	7	0.543

El análisis de los pacientes SM-RI y SM-SI no mostró diferencias significativas en la distribución de género, edad y frecuencia en el uso de medicación cardiovascular. Mientras que diversos parámetros bioquímicos no presentaron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes, los pacientes SM-RI mostraron un aumento significativo en el IMC, la circunferencia de la cintura, la PAD, el índice HOMA, los niveles plasmáticos de insulina, las LDLox y la MMP-9 y muestran niveles más bajos de c-HDL en plasma en comparación con los pacientes SM-SI. Por lo tanto, en nuestra cohorte de pacientes con SM, la RI se asocia con una mayor presencia de parámetros asociados a un mayor riesgo cardiovascular.

1.1.2. Estudio de la expresión de los componentes de la vía de señalización de la insulina en CMSPs

Estudios previos muestran que la señalización defectuosa a través de la vía de señalización de la insulina R-INS-(IRS)-PI3K-AKT produce DMT2 y RI (Cho et al., 2001; Gonzalez-Navarro et al., 2008; Withers et al., 1998). Con el fin de analizar la expresión de las vías de señalización de la insulina se analizó la expresión de las proteínas IRS y de los efectores intracelulares PI3K/AKT y de RAS/ERK (Nigro et al., 2006).

El análisis de la expresión de los componentes de la vía de señalización de la insulina a través de la vía PI3K/AKT mediante qPCR mostró una disminución, no significativa, en los niveles de ARNm de *Irs2* en CMSPs de pacientes SM-RI comparado con los pacientes SM-SI (**Figura 30B**). Los niveles de ARNm de *Akt2* fueron significativamente inferiores en pacientes SM-RI comparado con pacientes SM-SI mientras que *Akt1* y *Akt3* se expresaron de modo similar en los dos grupos de pacientes (**Figura 30C**). Además, se observó un aumento en la expresión de *Irs1* en pacientes SM-RI con comparado con los niveles en pacientes SM-SI. (**Figura 30A**).

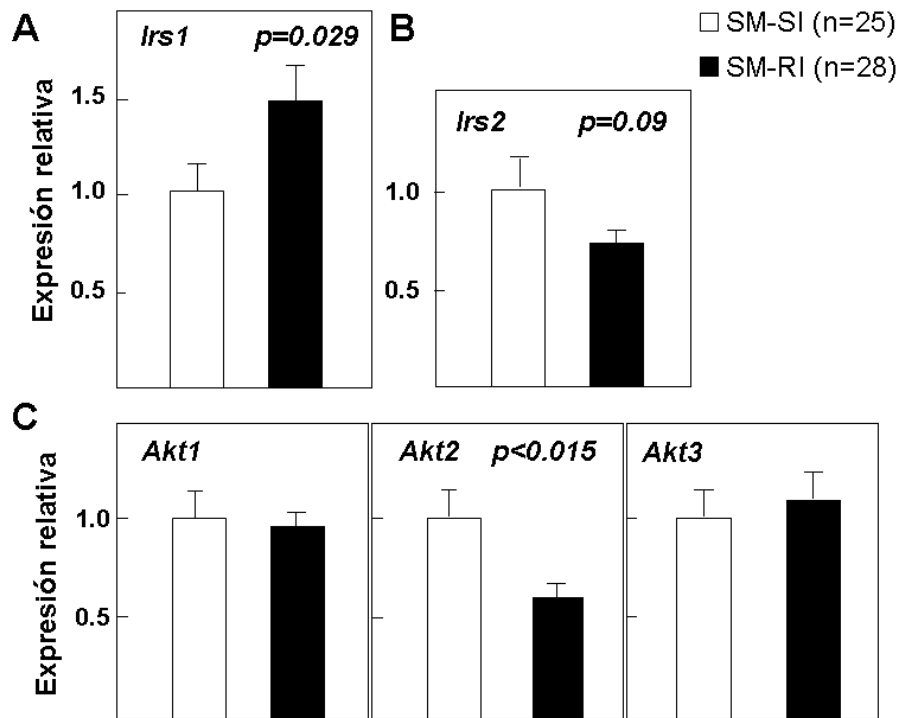


Figura 30. Estudio de la expresión mediante qPCR de los niveles de ARNm de los efectores intracelulares del receptor de la insulina en CMSPs. (A,B) En pacientes SM-RI se observó una disminución en los niveles del ARNm de *Irs2* y un aumento significativo del ARNm de *Irs1* comparado con pacientes SM-SI. **(C)** Los niveles de ARNm de *Akt2* fueron significativamente inferiores en pacientes SM-RI comparado con pacientes SM-SI mientras que la expresión de *Akt1* y *Akt3* no cambió. Los niveles de ARNm se normalizaron al gen endógeno *Gapdh* y se relativizaron a los niveles de ARNm de los pacientes control SM-SI (=1).

Además, el análisis de regresión demostró una correlación positiva entre la expresión de *Irs2* y *Akt2* en los pacientes con SM ($r^2=0.66$; $p<0.001$) (**Figura 31**).

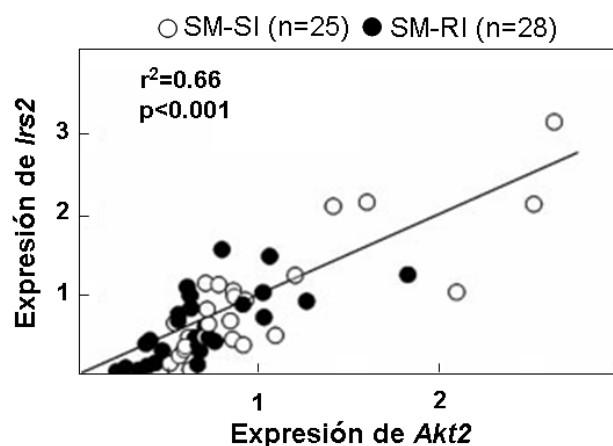


Figura 31. Correlación entre la expresión de los genes *Irs2* y *Akt2*. Estudios de correlación muestran una correlación positiva significativa entre la expresión de *Irs2* y de *Akt2* en pacientes con SM.

Seguidamente se estudió la expresión de los efectores de la vía de señalización de la insulina incluyendo las MAPK y ERK/RAS. El análisis de la expresión del ARNm no mostró diferencias significativas entre los pacientes SM-RI y SM-SI aunque se observó un ligero descenso no significativo en *Rras* (**Figura 32**).

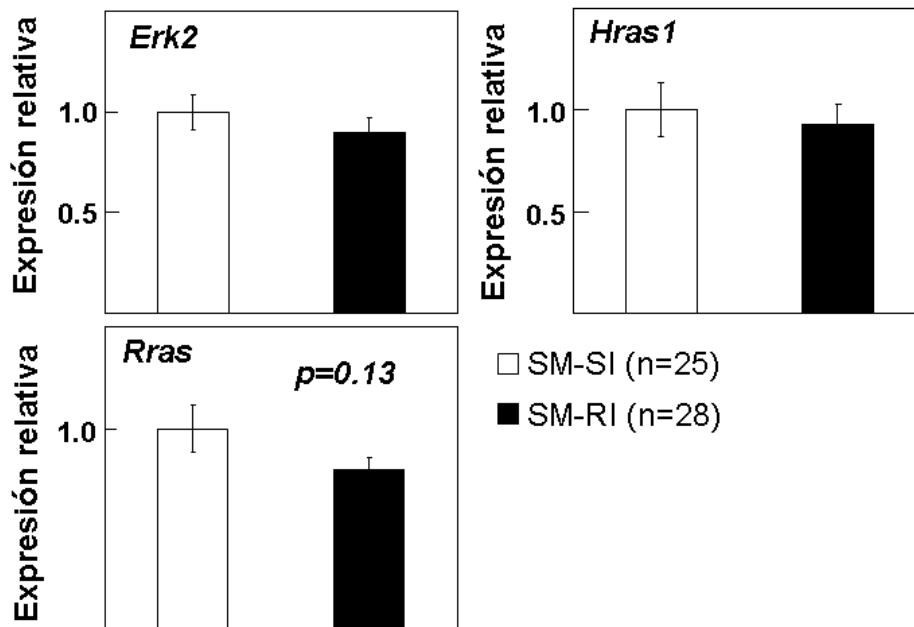


Figura 32. Expresión de los genes *Erk2*, *Hras1* y *Rras*. Estudios de la expresión mediante qPCR de los efectores intracelulares MAPK *Erk2*, *Hras1* y *Rras* del receptor de la insulina no mostraron diferencias entre los dos grupos de pacientes SM-RI vs SM-SI. En pacientes SM-RI la expresión de *Rras* se encontró ligeramente disminuida con respecto a los pacientes SM-SI aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

1.1.3. La expresión de *Irs2* y *Akt2* se correlaciona inversamente con los niveles de insulina e índice HOMA en pacientes SM-RI pero no en pacientes SM-SI

Con el fin de determinar si existía una relación entre el grado de RI y la expresión de ARNm de *Irs2* y *Akt2* en CMSPs se realizaron análisis de correlación entre los niveles de expresión y la concentración de insulina e índice HOMA de todos los pacientes con SM. El análisis mostró una correlación inversa significativa entre los niveles de ARNm de *Irs2* y *Akt2* y los niveles de insulina en pacientes con SM-RI pero no en pacientes SM-SI (**Figura 33A,C**). Resultados similares fueron obtenidos en los estudios de correlación entre los niveles de expresión de *Irs2* y *Akt2* y el índice HOMA (**Figuras 33B,D**), que mostraron una correlación inversa significativa en pacientes SM-RI pero no en pacientes SM-SI.

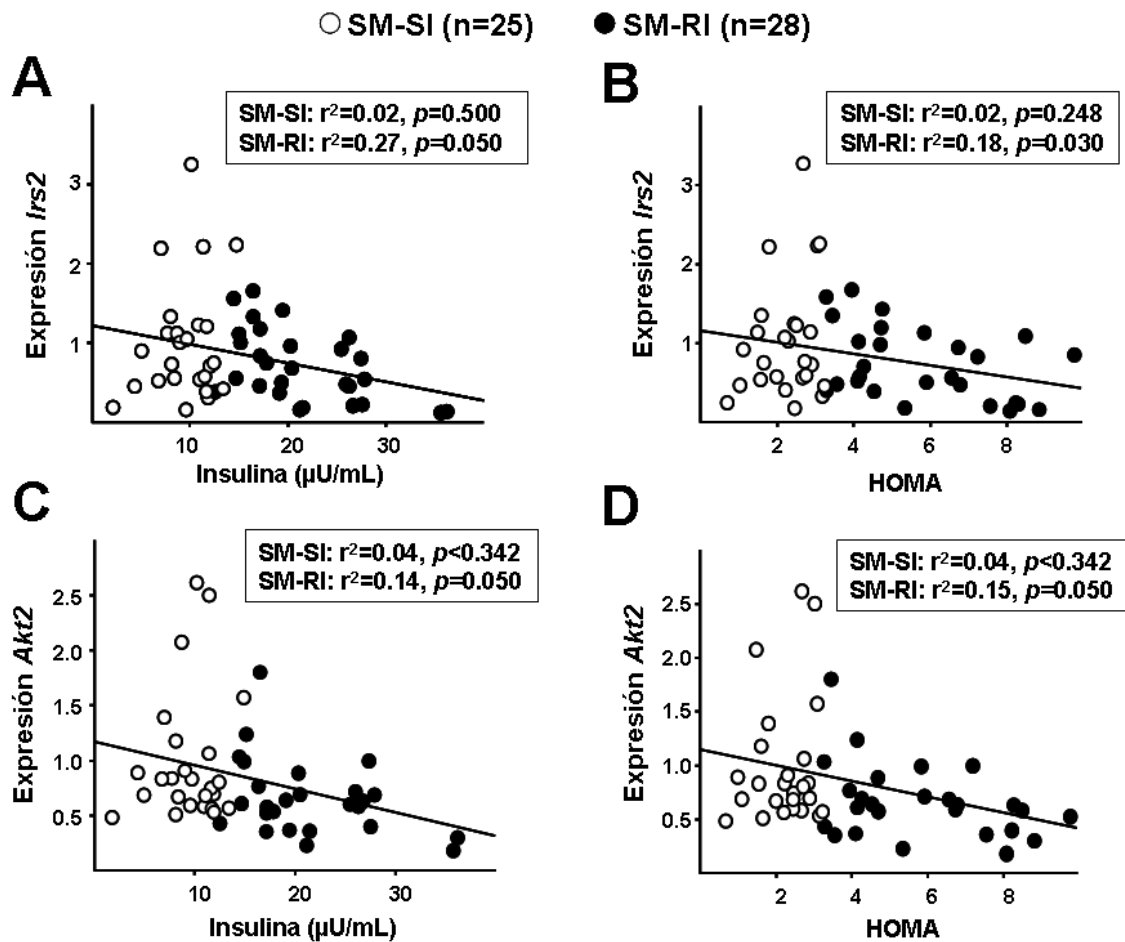


Figura 33. Análisis de regresión de los niveles de ARNm de *Irs2* y *Akt2*. En CMSPs de pacientes con SM-RI los niveles de expresión de *Irs2* se correlacionaron de manera inversa y significativa con los niveles de insulina plasmática (**A**) y con el índice HOMA (**B**). Del mismo modo, en estos pacientes, los niveles de *Akt2* en CMSPs presentaron una correlación inversa con los niveles de insulina plasmática (**C**) y con el índice HOMA (**D**). Estas correlaciones no se observaron en pacientes SM-SI. La recta de regresión mostrada en las gráficas corresponde a los pacientes SM-RI.

La ausencia de correlación *Irs2* y *Akt2* en pacientes SM-SI, tanto en los niveles de insulina plasmática como en el índice HOMA, indica que la hiperinsulinemia y la RI en pacientes con SM-RI se asocian a una disminución de la señalización mediada por *Irs2* y su efector *Akt2* en CMSPs.

1.2. Estudio del efecto de la inactivación parcial de *Irs2* en modelos murinos de hipercolesterolemia y aterosclerosis en el desarrollo de la placa de ateroma y en cambios de la expresión génica

Estudios previos en nuestro laboratorio y otros demuestran que la ausencia del gen *Irs2* en el modelo aterosclerótico hipercolesterolémico *apoE*^{-/-} produce características del SM y RI (Baumgartl et al., 2006; Gonzalez-Navarro et al., 2007). Dado que los estudios de expresión en pacientes mostraron que la vía de señalización mediada por *Irs2* está disminuida en condiciones de SM-RI en comparación con SM-SI, se generó un modelo animal con expresión reducida en *Irs2*. Para ello se inactivó parcialmente el gen *Irs2* en ratones *apoE*^{-/-} y se investigó su efecto en el metabolismo glucémico y lipídico así como sobre el desarrollo de la aterosclerosis y los mecanismos moleculares subyacentes.

1.2.1. En ratones *apoE*^{-/-} la inactivación parcial de *Irs2* combinada con hipercolesterolemia grave produce intolerancia a la glucosa y una leve hiperinsulinemia

La caracterización metabólica se realizó en ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta aterogénica rica en colesterol durante tres meses o alimentados con dieta control durante 10 meses. El análisis del plasma en ratones tratados con dieta aterogénica mostró un aumento no significativo de insulina en *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} comparado con *apoE*^{-/-} (1.00 ± 0.17 *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} vs 0.65 ± 0.14 $\mu\text{g/dL}$ para *apoE*^{-/-}, $p=0.074$), sin observarse cambios en los niveles de glucosa (**Figura 34D,E**). En ratones sometidos a dieta aterogénica el análisis del peso corporal no mostró diferencias significativas entre genotipos (**Figura 34F**). Sin embargo, el peso corporal en ratones con dieta control fue ligeramente menor en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} (**Figura 34C**) aunque no se vio afectado ningún parámetro metabólico. Estos resultados permiten excluir la obesidad como factor causante de las alteraciones metabólicas exhibidas por los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} sometidos a dieta aterogénica.

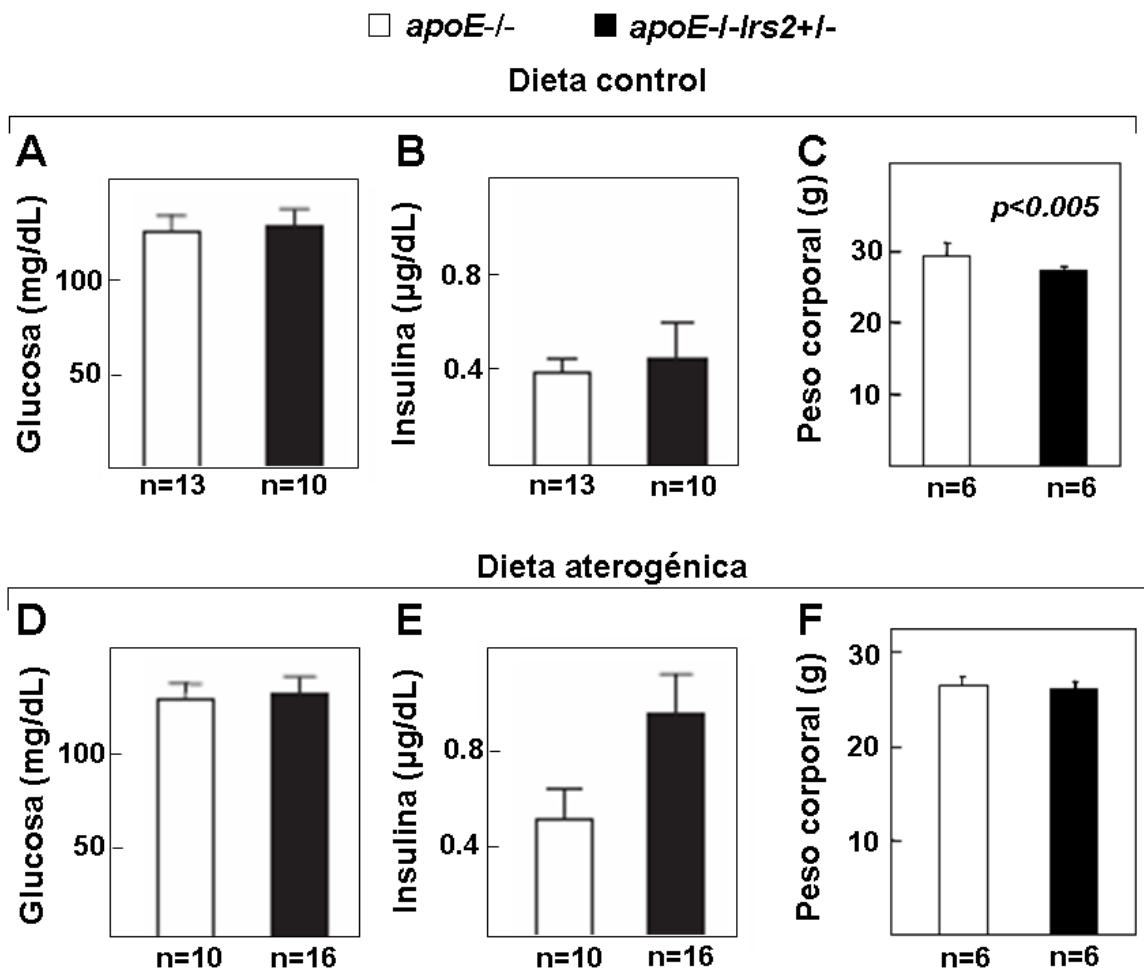


Figura 34. Niveles plasmáticos de glucosa e insulina y peso corporal de ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-Irs2}^{+/-}. Los ratones fueron alimentados con dieta control (A-C) o dieta aterogénica (D-F). Las gráficas muestran los niveles plasmáticos de glucosa e insulina y el peso corporal.

El análisis de la tolerancia a la glucosa mediante el TTG, expresada con el parámetro AUC, no mostró diferencias entre los ratones *apoE*^{-/-Irs2}^{+/-} y *apoE*^{-/-} alimentados con dieta control (**Figura 35A**). Sin embargo, los ratones *apoE*^{-/-Irs2} alimentados con dieta aterogénica durante 3 meses, mostraron mayor intolerancia a la glucosa en comparación con ratones *apoE*^{-/-} ($p < 0.05$) (**Figura 35B**). La secreción de insulina estimulada por glucosa durante el TTG fue similar en ambos grupos de ratones alimentados con dieta aterogénica o control (**Figura 35A,B**).

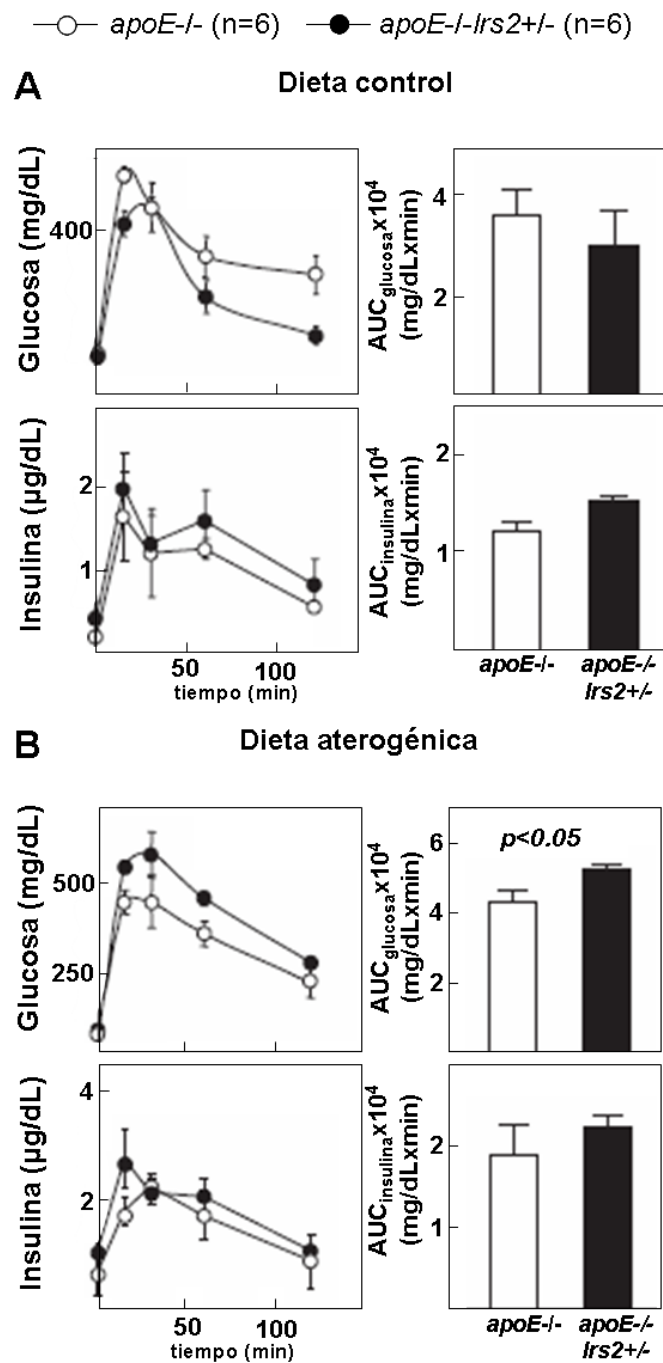


Figura 35. Test de tolerancia a la glucosa (TTG) y análisis de la secreción de insulina en ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta control y dieta aterogénica. Niveles plasmáticos de glucosa e insulina en ratones alimentados con dieta control (A) y aterogénica (B) durante el TTG. A la derecha de cada gráfica se muestran los valores de AUC_{glucosa} y AUC_{insulina} que analizan la tolerancia a la glucosa y la insulina secretada, respectivamente, durante el test.

1.2.2. El metabolismo lipídico en ratones *apoE*^{-/-} no se ve afectado por la eliminación de un alelo de *Irs2*

Los niveles circulantes de c-Total, de c-HDL y de TAG en ayunas fueron indistinguibles entre ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta control (Figura 36A) o dieta aterogénica durante 3 meses (Figura 36B). Los niveles de c-Total y TAG en ratones de ambos genotipos alimentados con dieta aterogénica se incrementaron en comparación con los valores predieta (Figura 36B). Estos resultados indican que el metabolismo lipídico de los ratones *apoE*^{-/-} no se ve afectado por la inactivación de un alelo de *Irs2*.

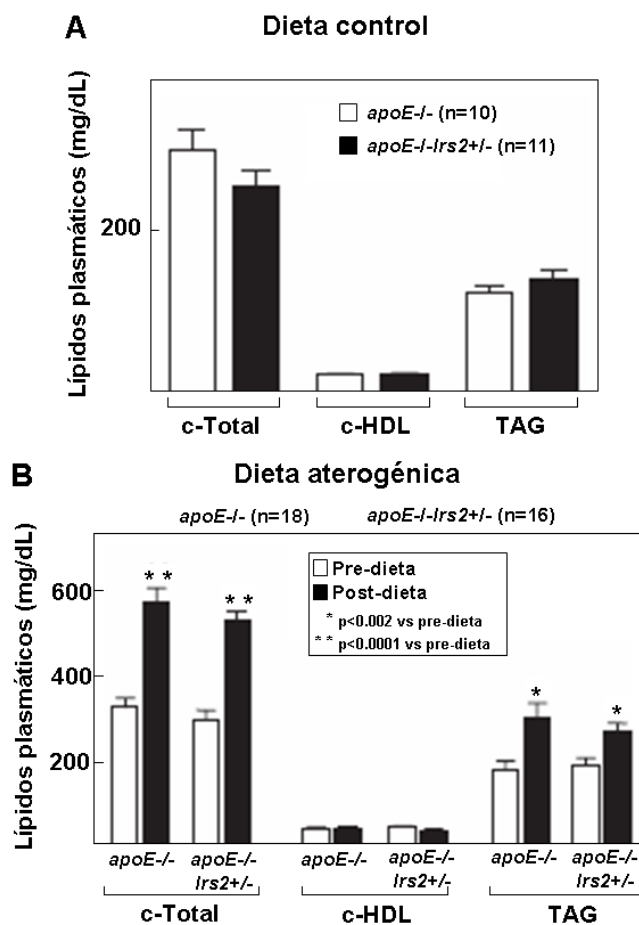


Figura 36. Niveles plasmáticos de c-Total, c-HDL y TAG en ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}. Los ratones fueron alimentados con dieta control (A) o dieta aterogénica (B) y se determinaron los niveles plasmáticos de c-Total, c-HDL y TAG tras 15 horas de ayuno.

En resumen, la caracterización metabólica de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} y *apoE*^{-/-} demuestra que la inactivación parcial de *Irs2* en presencia de hipercolesterolemia inducida por dieta produce alteraciones metabólicas similares a las del SM y la RI.

1.2.3. La inactivación parcial de *Irs2* en ratones *apoE*^{-/-} combinada con hipercolesterolemia grave acelera la aterosclerosis sin cambios en la composición de la placa de ateroma

Para estudiar el efecto de las alteraciones metabólicas inducidas por la inactivación parcial de *Irs2* se analizó el desarrollo de la placa ateromatosa en ratones alimentados con dieta aterogénica o control. El análisis de la aterosclerosis *en face* en el cayado aórtico mediante tinción por Oil-Red O mostró tamaños similares de placa de ateroma en ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta control (**Figura 37A**). Por el contrario, el análisis de ratones sometidos a dieta aterogénica durante 3 meses mostró un aumento significativo del tamaño de las lesiones ateromatosas en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} comparado con *apoE*^{-/-} (**Figura 37B**).

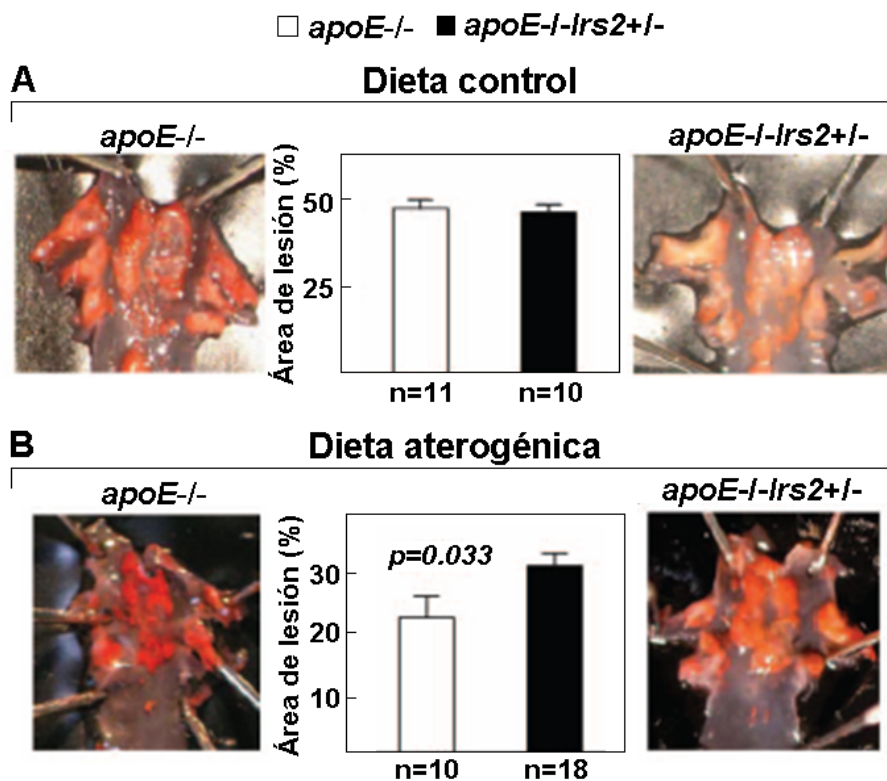


Figura 37. Análisis de la aterosclerosis en el arco aórtico de ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}. Los ratones se alimentaron con dieta control (**A**) o aterogénica (**B**) y se analizó el tamaño de las lesiones ateromatosas en el cayado de la aorta tras tinción *en face* con Oil-Red O.

Seguidamente, se investigó el efecto de las alteraciones metabólicas observadas en los ratones *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-} en la composición de la placa de ateroma. Para ello se analizó su contenido en macrófagos y en cMLVs mediante inmunohistoquímica con los marcadores celulares Mac-3 y SM- α -actina, respectivamente, y el contenido en colágeno mediante tinción de Masson. Estos estudios demostraron que la inactivación parcial de *Irs2* no afecta a la composición de la placa en los ratones *apoE*^{-/-} ni alimentados con dieta control (**Figura 38A**) ni con dieta aterogénica durante 3 meses (**Figura 38B**).

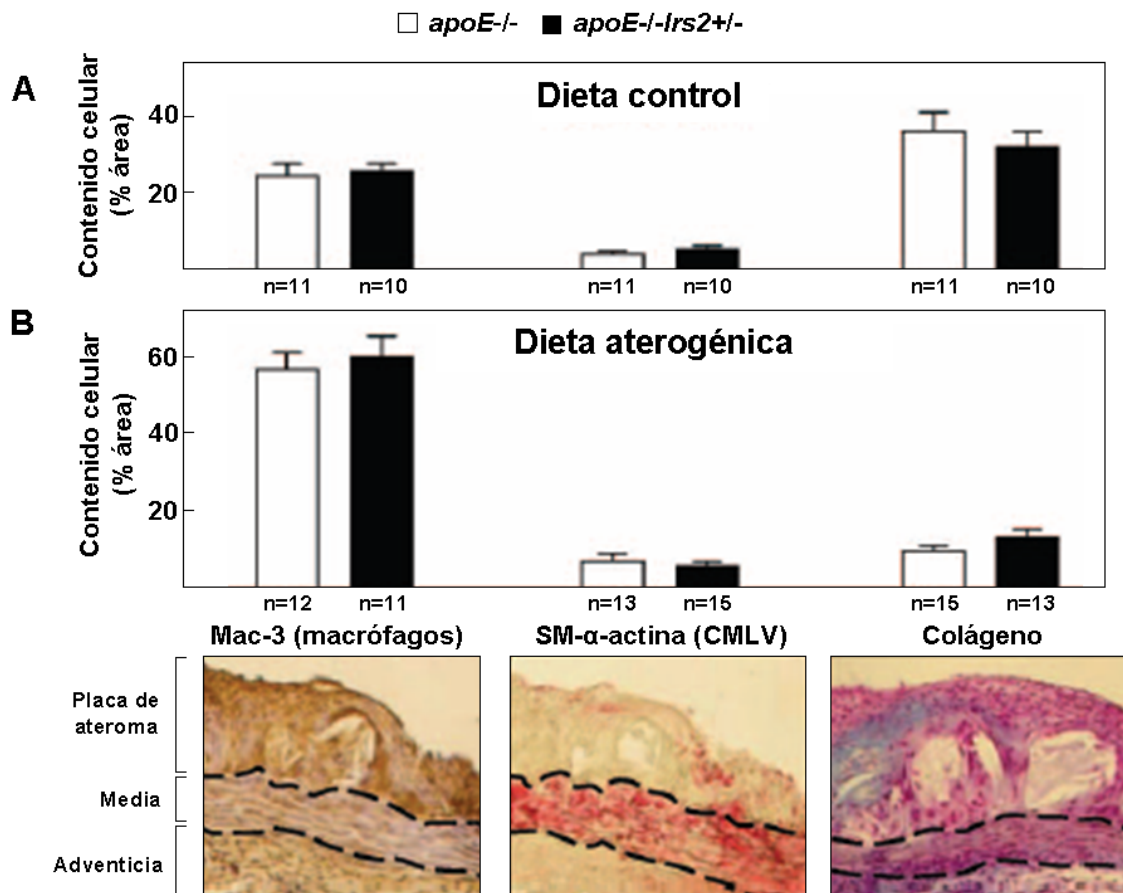


Figura 38. Caracterización de la composición de la placa de ateroma en ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-}. La composición de la placa se analizó en ratones alimentados con dieta control (**A**) y con dieta aterogénica (**B**) mediante inmunohistoquímica anti Mac-3 y anti-SM- α -actina para la determinación, respectivamente, del contenido en macrófagos y en cMLVs. La determinación del contenido de colágeno se realizó mediante tinción tricrómica de Masson. Los resultados se expresan en porcentaje de área con respecto al total del área teñida del ateroma.

1.2.4. La inactivación de un alelo de *Irs2* se asocia con un aumento en la captación de LDLac y un aumento en la expresión de receptores *scavenger* en los macrófagos

La captación de LDL modificadas por parte de los macrófagos es un evento inicial que juega un papel clave en el desarrollo de la placa ateromatosa (Glass and Witztum, 2001). Por ello, a continuación investigamos las consecuencias de la reducción en la expresión de *Irs2* sobre la captación por parte de los macrófagos de LDLac marcadas con Alexa Fluor 488. El análisis mediante citometría de flujo de los macrófagos de los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* mostró un incremento del 30% en la captación de Alexa Fluor 488-acLDL en comparación con los controles *apoE^{-/-}*, medido como intensidad media de la fluorescencia (**Figura 39A**).

Para investigar si los cambios en la captación se correlacionaban con cambios en la expresión génica de los receptores *scavenger* se estudió la expresión de los principales receptores implicados en la captación de LDLac, los receptores CD36 y Sra. El análisis de la expresión mediante qPCR mostró un aumento significativo de los niveles de ARNm de ambos receptores (**Figura 39B**).

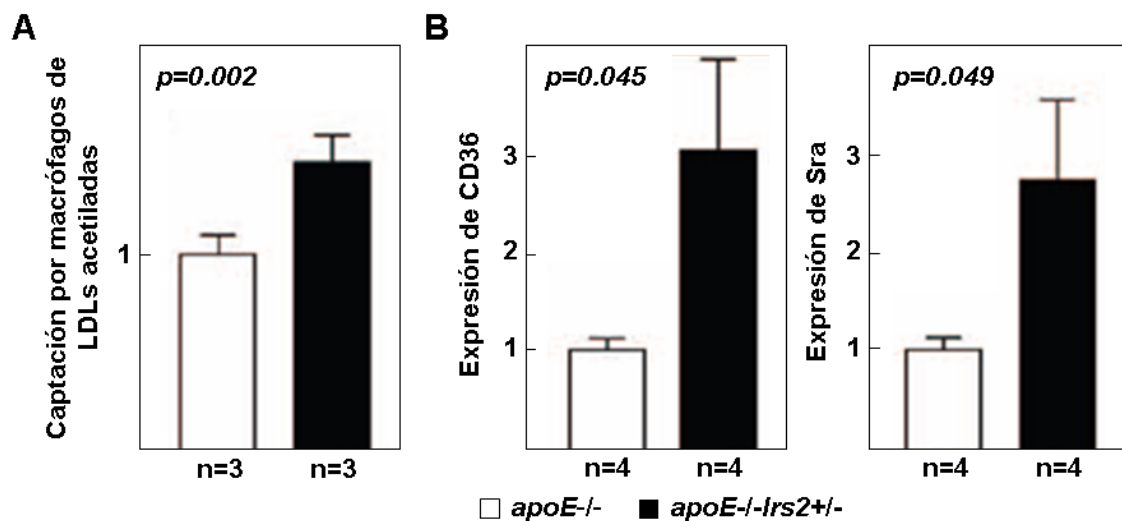


Figura 39. Captación de LDLac y expresión de receptores *scavenger* en MDMO. (A)MDMO de ratones *apoE^{-/-}* y *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* se incubaron con LDLac conjugadas al fluoróforo Alexa Fluor 488. Tras 4 horas se analizó por citometría de flujo la intensidad media de la fluorescencia. (B) Niveles de expresión de los receptores *scavenger* CD36 y Sra medidos mediante qPCR. En todos los casos los resultados se expresan relativizados a *apoE^{-/-}* (=1).

1.2.5. Estudios de la expresión en el cayado aórtico

Dado que la inactivación parcial de *Irs2* en el ratón deficiente en *apoE*^{-/-} acelera la aterosclerosis, quisimos analizar en el cayado aórtico de los ratones cambios en la expresión de genes relacionados con la señalización por insulina. Para ello utilizamos un sistema comercial que permite analizar mediante qPCR la expresión de 84 genes de la vía de señalización por insulina (**Tabla 13**). Para estudiar cambios en etapas tempranas que pudieran afectar al desarrollo de la placa de ateroma, el análisis de expresión se realizó en cayado aórtico de ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta aterogénica durante sólo 2 meses.

Tabla 13. Listado de los 84 genes analizados en el *Insulin Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array System*. Los genes en color son los 14 genes que mostraron disminución en la expresión (en rojo) o aumento (en verde) en el arco aórtico de ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} con respecto a los ratones *apoE*^{-/-} alimentados con dieta aterogénica durante 2 meses (ver Figura 40). Los genes se muestran clasificados en diferentes categorías según indica el fabricante. Algunos de los genes están incluidos en más de una categoría.
(SuperarrayBioscience; http://www.superarray.com/rt_pcr_product/HTML/PAMM030A.html).

Proteínas asociadas al receptor de la insulina	Ins1, InsI3, Irs1, Irs2 , Sorbs1, Igf1r, Igfbp1, Cbl, Grb10, Grb2, Dok1, Dok2, Dok3, Eif4ebp1, Frs2, Frs3, Gab1, Nck1 , Ppp1ca, Ptpn1, Ptpnf, Shc1
Vía de PI3K	Akt1, Akt2 , Akt3, Eif2b1, Frap1, Pdpk1, Pik3ca, Pik3cb, Pik3r1, Pik3r2, Prkcc , Prkci , Prkcz, Adra1d, Bcl2l1, Dusp14, G6pc , G6pc2 , Hk2, Igfbp1, Pck2, Serpine1, Sreb1, Ucp1, Vegfa
Vía de MAPK	Araf, Braf, Dok2, Dok3, Gab1, Grb2, Hras1 , Kras, Map2k1, Mapk1, Raf1, Rps6ka1, Rras , Rras2, Shc1 , Sos1, Bcl2l1, Ercc1, Fos, Nos2, Klf10 (Tieg1), Ucp1
Genes diana principales de la insulina	Cebpb, Fos, Jun, Lep, Prl
Efectores secundarios de la señalización por insulina	Npy, Pck2, Tg
Genes diana de PPAR γ	Acox1, Cfd (Adn), Cap1, Cebpb, Gpd1, Pck2, Pparg, Retn, Slc27a4
Genes diana de SREBP1	Acaca, Fbp1, G6pc , Gck, Pck2, Pklr
Metabolismo de carbohidratos	Fbp1, G6pc , Gck, Gpd1, Hk2, Ins1, Lep, Pck2, Pklr, Ppp1ca, Slc2a1, Sorbs1.
Metabolismo lipídico	Ldlr , Lep, Sreb1, Acox1, Slc27a4, Sorbs1, Araf, Prkcc , Prkci , Prkcz, Raf1, Shc1
Metabolismo proteico	Dusp14 , Ppp1ca, Ptpn1, Ptpnf, Akt1, Akt2 , Akt3, Araf, Gsk3b, Igf1r, Map2k1, Mapk1, Pdpk1, Pik3ca, Pik3r1, Prkcc , Prkci , Prkcz, Raf1, Rps6ka1, Eif2b1, Eif4ebp1, Ppp1ca, Hras1 , Prkci, Rras2, Bcl2l1, Cebpa , Cebpb, Dok3, Frs2, Gab1, Gck, Grb10, Grb2, Jun, Ldlr , Lep, Nck1 , Nos2, Pik3r2, Serpine1, Shc1 , Sorbs1, Sos1, Ucp1
Factores de transcripción y reguladores	Aebp1, Cebpa , Cebpb, Fos, Jun, Pparg, Sreb1, Klf10 (Tieg1)
Crecimiento celular y diferenciación	Gsk3b, Hras1 , Igf2, Jun, Kras, Mapk1, Irs2 , Lep, Nos2, Frs2, Igf1r, Igf2, Igfbp1, Lep, Shc1 , Vegfa, Cebpa , Cebpb, Map2k1, Pik3r1, Pparg.

El análisis mostró cambios significativos en la expresión de 11 genes y de 3 con cambios casi significativos ($p=0,06$) (**Figura 40**). Entre los genes alterados en el cayado aórtico de ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} se encontraron varios relacionados con el

metabolismo glucémico y lipídico (*G6pc*, *G6pc2*, *Ldlr*), quinasas y fosfatasa (*Dusp14*, *Nck1*, *Prkc*), factores de transcripción (*Cebpa*, *Klf10*) y genes estructurales (*Shc1*).

Como era de esperar, se observó una disminución de la expresión de *Irs2* en el cayado aórtico de ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}. La expresión de los genes efectores de *Irs2*, *Akt2*, *Rras* y *Hras1* fue significativamente menor en los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta aterogénica sugiriendo que la inactivación de *Irs2* afecta negativamente a la vía de señalización de la insulina en tejido aórtico de estos animales.

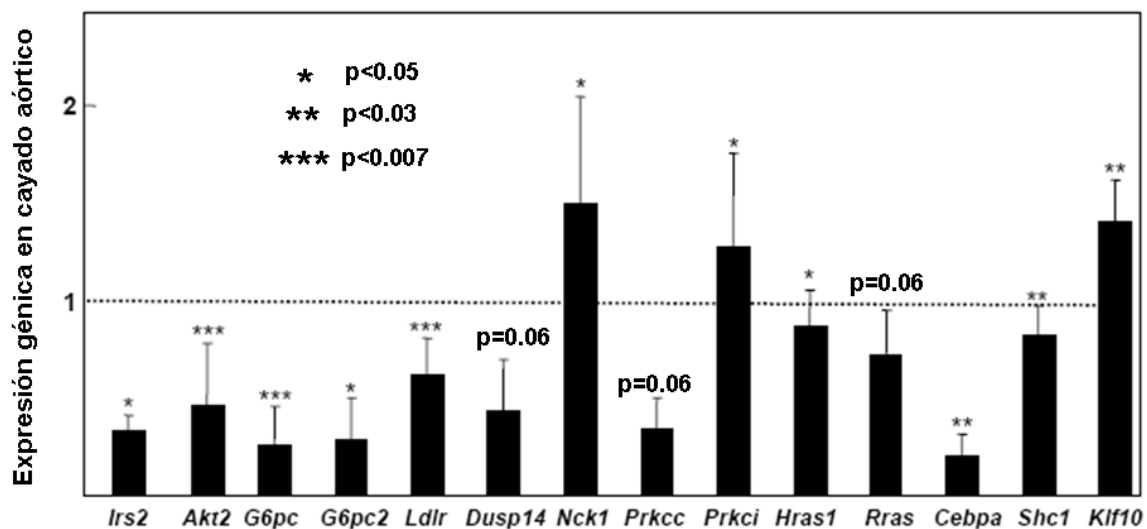


Figura 40. Niveles de expresión de genes de la señalización de la insulina alterados en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}. El perfil génico se realizó en tejido aórtico de ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados durante 2 meses con dieta aterogénica. Se muestran los niveles de ARNm en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} normalizados según indica el array y relativizados a los niveles de ARNm de los ratones control *apoE*^{-/-} (=1). Los asteriscos indican las diferencias significativas entre genotipos ($p < 0.05$, test *t*-Student).

Con el fin de comprobar si existe una correlación entre progresión de la placa de ateroma y una disminución de la ruta de señalización de la insulina en el cayado aórtico también se estudió la aterosclerosis en el inicio de la aorta de los mismos ratones sometidos a dieta aterogénica durante 2 meses. Consistente con los resultados obtenidos en ratones alimentados 3 meses con dieta aterogénica, observamos un aumento del tamaño de la lesión ateromatosa en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} comparado con ratones *apoE*^{-/-} alimentados con dieta aterogénica durante 2 meses (**Figura 41A**). Igualmente, el análisis de la composición de la placa de ateroma tampoco evidenció diferencias en el contenido de macrófagos, de cMLVs y de colágeno entre ratones *apoE*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} (**Figura 41B**).

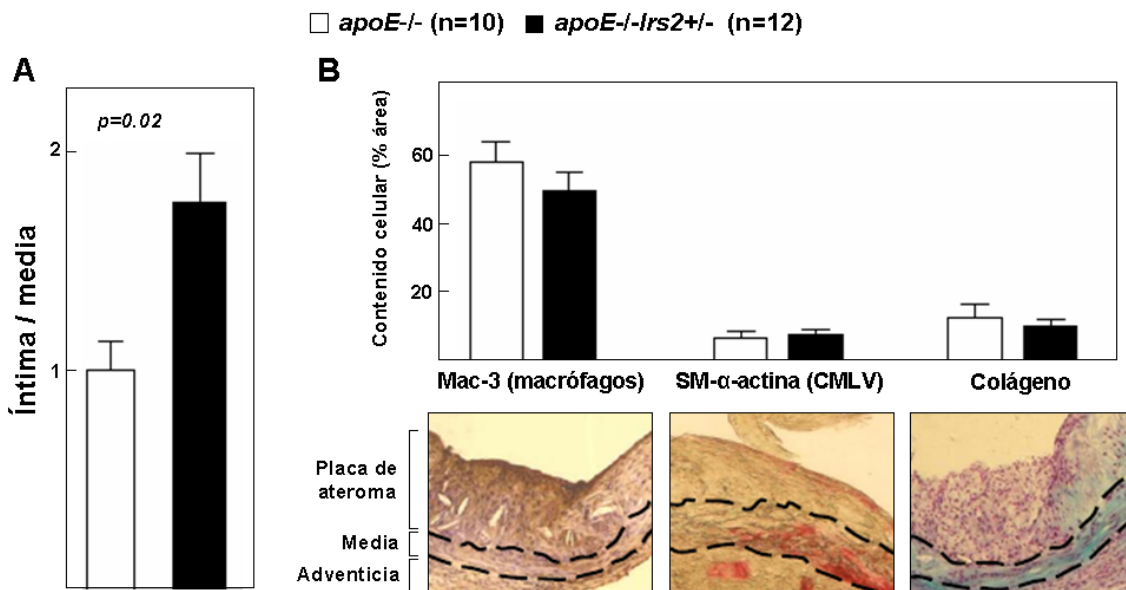


Figura 41. Análisis de la composición y del tamaño de la placa de ateroma en ratones alimentados durante 2 meses con dieta aterogénica. (A) La cuantificación de la aterosclerosis se realizó mediante análisis planimétrico de secciones histológicas del seno aórtico. El tamaño del ateroma se calculó mediante la relación íntima/media y los resultados se expresaron relativos a *apoE*^{-/-} (n=10). **(B)** Análisis del contenido en macrófagos, cMLVs y colágeno, expresados en porcentaje de área con respecto al total del área del ateroma. Las marcas discontinuas delimitan la capa media.

1.2.6. La disrupción de la señalización de la insulina mediada por *Irs2* y sus efectores intracelulares induce la expresión de la citoquina proaterogénica *Mcp1*

La aterosclerosis, DMT2 y RI se caracterizan por una inflamación crónica en diferentes tejidos (Furuhashi et al., 2007; Kuiper et al., 2007; Lumeng et al., 2007; Mallat and Tedgui, 2007; Rader and Daugherty, 2008). Para investigar si la disrupción de la vía de la señalización de la insulina como consecuencia de la inactivación parcial de *Irs2* juega un papel en la inflamación asociada a la aterosclerosis se investigó la expresión génica de la citoquina proinflamatoria *Mcp1* en la placa de ateroma y en cultivos celulares. El análisis mediante qPCR mostró un aumento significativo en la expresión de *Mcp1* en el cayado aórtico, en MDMO y en cMLVs de ratones *apoE*^{-/-Irs2}^{+/-} alimentados con dieta aterogénica en comparación con los controles *apoE*^{-/-} (Figura 42).

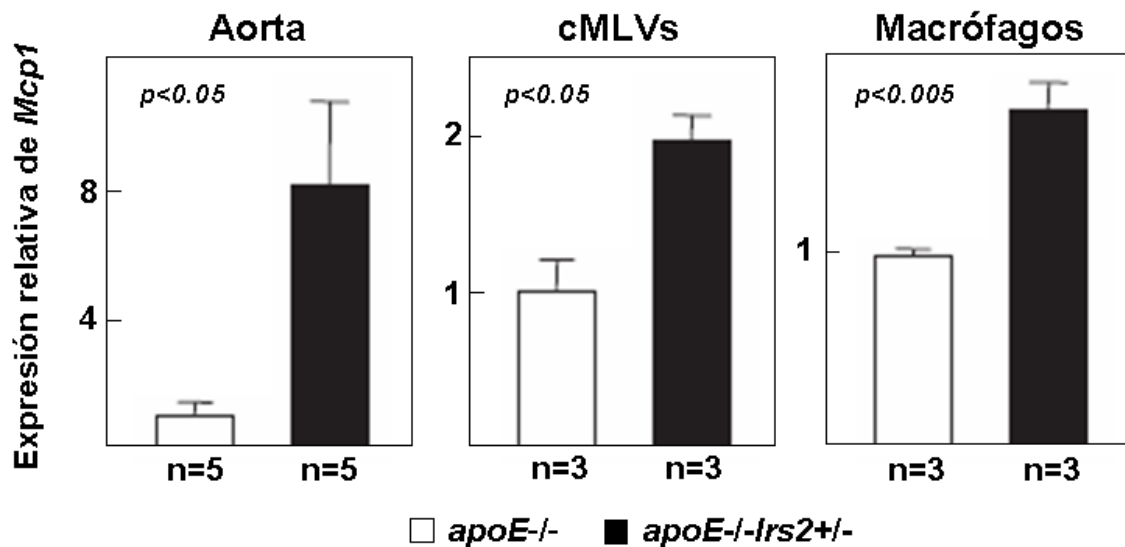


Figura 42. Expresión de *Mcp1* en cayado aórtico y en cultivos primarios de cMLVs y de MDMO. El análisis de la expresión mediante qPCR demostró un aumento significativo en la expresión de la citoquina proinflamatoria *Mcp1* tanto en aorta (n=5 *pools* de 2 cayados aórticos por genotipo) como en macrófagos y en cMLVs de ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} en comparación con controles *apoE*^{-/-} alimentados con dieta aterogénica. Los niveles de ARNm en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} fueron normalizados con controles endógenos de expresión y relativizados respecto a los resultados obtenidos en ratones control *apoE*^{-/-} (=1).

1.2.7. El bloqueo de la ruta de la señalización de la insulina induce la secreción de la citoquina proaterogénica *Mcp1*

Teniendo en cuenta que los resultados de nuestros estudios de expresión en aorta muestran una reducción en los niveles de ARNm de *Akt2*, *Hras1* y *Rras* (**Figura 40**) se investigó la posible relación causal entre una señalización defectuosa a través de AKT2 o ERK1/2 (efector de la señalización de RAS) y un aumento de la expresión de *Mcp1* asociada a una reducción en la expresión de *Irs2* (**Figura 42**). Con esta finalidad se realizaron experimentos de inhibición farmacológica de las quinasas AKT y ERK1/2. La inhibición de forma independiente de AKT mediante el inhibidor VIII y de ERK1/2 mediante el inhibidor U0126 aumentó la expresión de *Mcp1* en cultivos de cMLVs de rata (**Figura 43A**) indicando que la disrupción de la ruta de señalización AKT-ERK está asociada con un aumento de la expresión de *Mcp1*. Además se demostró mediante Western Blot la efectividad de la inhibición de las quinasas AKT y ERK viéndose reducida la expresión de las formas fosforiladas (activas) de AKT1/2 y ERK1/2 en cMLVs tratadas con los diferentes inhibidores (**Figura 43B**).

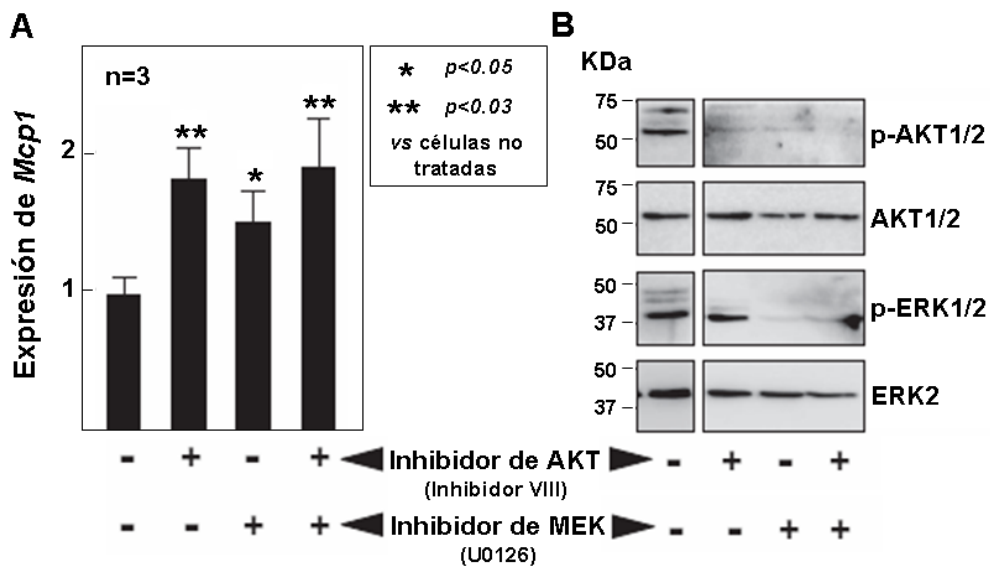


Figura 43. Efecto de la inhibición farmacológica de las quinasas AKT y ERK1/2 en los niveles de expresión de *Mcp1* y en los niveles proteicos de sus formas activadas. (A) La inhibición de las quinasas AKT (inhibidor VIII) o de ERK1/2 (U0126) o de ambas aumenta los niveles de ARNm de *Mcp1* en cultivos de cMLVs de rata. (B) Análisis mediante Western Blot de AKT1/2 y ERK2 y de sus respectivas formas activadas fosforiladas (pAKT1/2, pERK1/2) de extractos proteicos de cMLVs de rata tratadas según se indica con los diferentes inhibidores.

La efectividad de los inhibidores VIII y U0126 se demostró adicionalmente mediante el análisis de la expresión de efectores de AKT y ERK1/2 en cMLVs. Así, comprobamos que el inhibidor VIII reduce la cantidad de fosfo-AKT1/2 y de fosfo-70^{S6K} (que aumenta cuando se activa AKT) (Figura 44A). Además, verificamos que U0126 reduce la expresión de fosfo-ERK1/2 y c-Fos inducidos por reestimulación con suero de células ayunadas (Figura 44B).

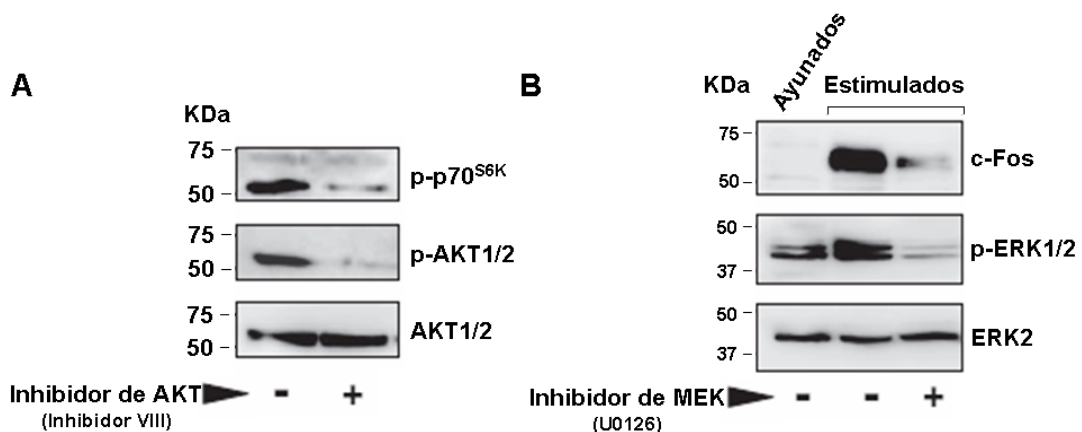


Figura 44. Efecto de la inhibición farmacológica de las quinasas AKT y ERK1/2 sobre sus efectores intracelulares en cMLVs. (A) La efectividad del inhibidor VIII se demostró mediante la reducción de la forma activada fosforilada de su efector p70^{S6K} (que aumenta cuando se activa AKT). (B) La efectividad del inhibidor de ERK1/2, U0126, se demostró mediante la disminución de la expresión de c-Fos inducible por suero (que depende de la activación de ERK1/2).

2. Estudio del papel del locus *Ink4/Arf* en el desarrollo de resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa asociada a la edad

2.1. Estudio del papel del locus *Ink4/Arf* en cambios de la homeostasis de la glucosa y de la insulina asociada a la edad

2.1.1. Los ratones *Super-Ink4/Arf* muestran un aumento moderado en la expresión de p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y p19^{ARF} en hígado

Con el fin de investigar el papel del locus *Ink4/Arf* en el metabolismo de los carbohidratos se utilizaron ratones transgénicos *Super-Ink4/Arf* que poseen una copia extra del locus bajo la regulación de su promotor endógeno, por lo que se comporta de manera similar al gen endógeno (Matheu et al., 2004). Varios autores han demostrado que la expresión del locus *Ink4/Arf* es baja a edades tempranas y aumenta con la edad en distintos tejidos, por lo que puede considerarse un biomarcador de envejecimiento (Krishnamurthy et al., 2004). Por otro lado se ha demostrado que los ratones *Super-Ink4/Arf* muestran una baja expresión del locus *Ink4/Arf* en edades tempranas y un aumento moderado a 1.5 años de edad (Matheu et al., 2007; Matheu et al., 2004). En este segundo objetivo de la tesis se investigó el efecto de una dosis extra del locus *Ink4/Arf* en el metabolismo de los carbohidratos durante el envejecimiento. Para ello se caracterizaron ratones *WT* y ratones *Super-Ink4/Arf* de 0.5 y 1 año de edad.

Consistente con los estudios previos, el análisis mediante qPCR de la expresión génica en ratones de 1 año de edad mostró un aumento moderado de la expresión del ARNm de p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y p19^{ARF} en el hígado de ratones *Super-Ink4/Arf* en comparación con los ratones *WT* aunque sólo las diferencias en p15^{INK4b} mostraron significatividad estadística (**Figura 45A**). El análisis de los niveles de ARNm en músculo esquelético, corazón e islotes pancreáticos no mostró diferencias significativas en la expresión de p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y p19^{ARF} y p19^{ARF} no fue detectado en músculo esquelético (**Figura 45A**). De manera similar, el análisis de los niveles de proteína mediante Western Blot mostró ligeros aumentos de expresión no significativos de p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y p19^{ARF} en hígado de ratones *Super-Ink4/Arf* comparado con los ratones *WT* (**Figura 45B**). En músculo esquelético, corazón e islotes pancreáticos no se observaron diferencias significativas (**Figura 45B**).

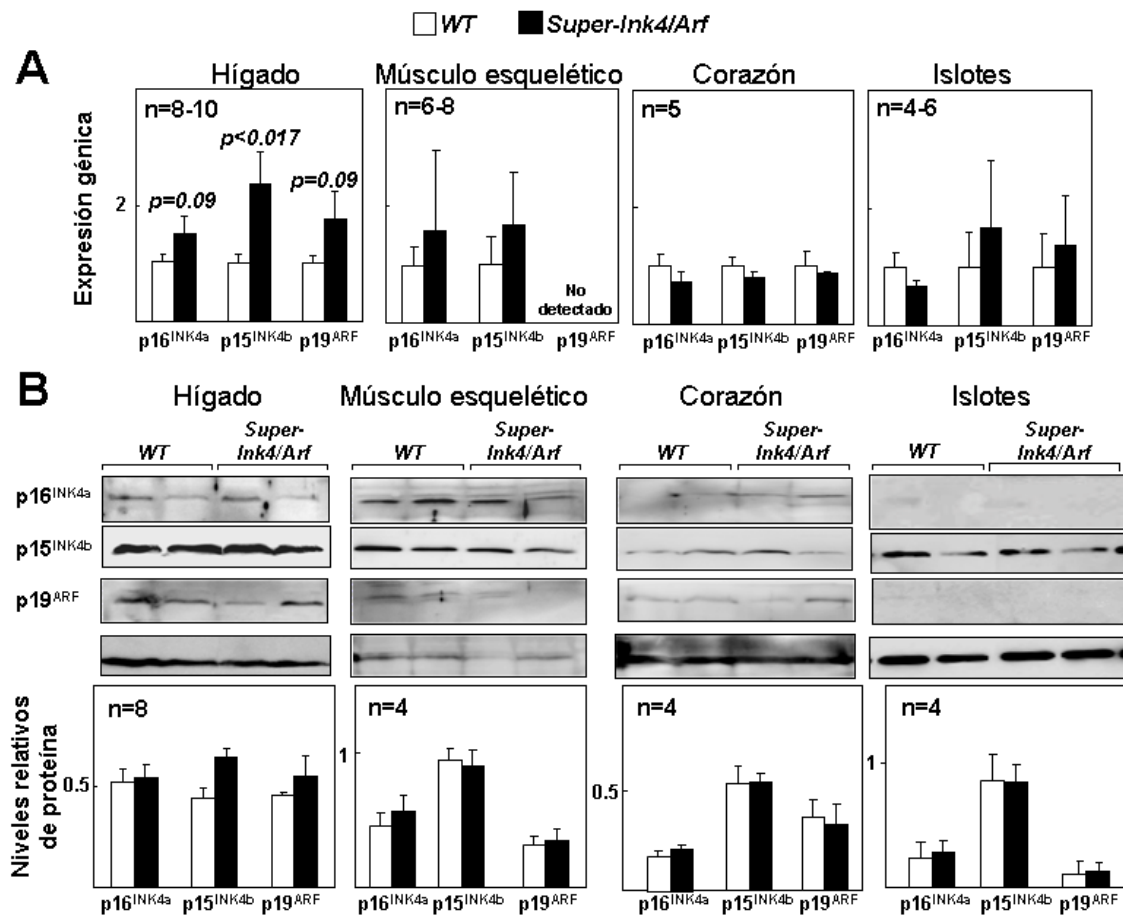


Figura 45. Expresión del locus *Ink4/Arf* en ratones *Super-Ink4/Arf* y *WT* de 1 año de edad. **(A)** Análisis de la expresión génica mediante qPCR de p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y p19^{ARF} en hígado, músculo esquelético, corazón e islotes pancreáticos aislados. Los niveles de expresión fueron normalizados al control endógeno ciclofilina y los resultados fueron relativizados con respecto al ratón *WT* (=1). **(B)** Análisis de los niveles de proteína mediante Western Blot de hígado, músculo esquelético, corazón (250µg) e islotes pancreáticos (75µg) mediante anticuerpos específicos frente a p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p19^{ARF} y β-actina. Los Western Blots mostrados son representativos y los resultados son la media de entre 4 y 8 blots independientes. Los niveles de proteína fueron relativizados a los niveles de β-actina.

A pesar del aumento moderado en la expresión de los productos génicos del locus, la presencia de una dosis génica extra del locus *Ink4/Arf* produjo cambios funcionales. Efectivamente, comprobamos que la apoptosis de MDMO de ratones *Super-Ink4/Arf* era superior que en las células de controles *WT*, tanto en condiciones basales como tras exposición a luz ultravioleta (**Figura 46**).

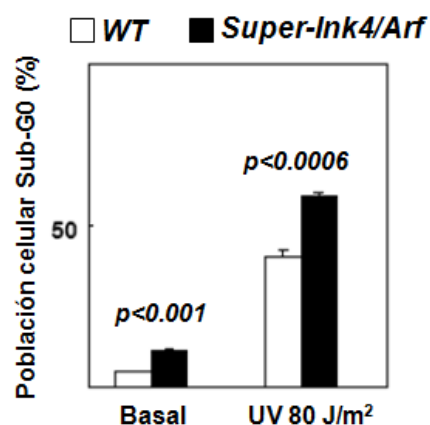


Figura 46. Ensayo de la funcionalidad del locus *Ink4/Arf*. Para determinar la funcionalidad de la copia extra del locus *Ink4/Arf* se estudió en MDMO de ratones *Super-Ink4/Arf* y *WT* de 1 año de edad la apoptosis en condiciones basales e inducida con luz UV (80 J/m²). Las células apoptóticas se identificaron como la población sub-G0 en el análisis de citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio.

2.1.2. La presencia de una copia extra del locus *Ink4/Arf* protege frente a trastornos de la glucosa y de la insulina

El análisis de la glucosa en plasma no mostró diferencias significativas entre los ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 0.5 años de edad (**Figura 47A**). Sin embargo, la glucemia fue significativamente mayor en los ratones *WT* comparado con ratones *Super-Ink4/Arf* de 1 año de edad (**Figura 47A**). Interesantemente, la glucemia aumentó con la edad en ratones *WT* (glucosa *WT* 1 año 87.0 ± 4.0 vs *WT* 0.5 años 76.0 ± 4.0, p<0.04). De forma similar, los niveles de insulina fueron superiores en los ratones *WT* de 1 año de edad en comparación con los ratones *Super-Ink4/Arf* y se observó una ligera disminución en la insulina basal dependiente de la edad en ambos genotipos (**Figura 47B**). El peso corporal aumentó de forma significativa con la edad en los dos grupos de ratones, pero no se observaron diferencias entre genotipos ni a 0.5 ni a 1 año de edad (**Figura 47C**).

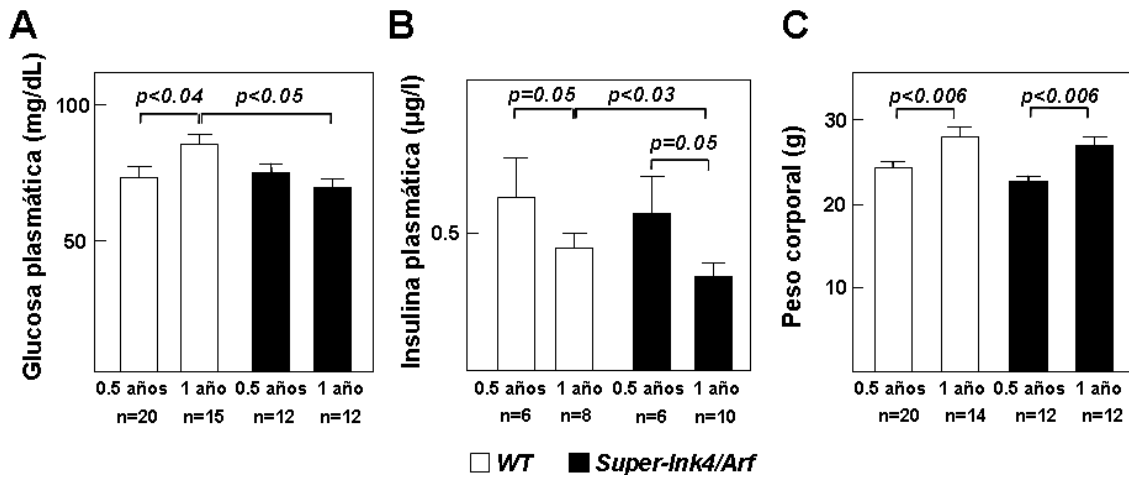


Figura 47. Efecto de la edad y del aumento de la dosis de *Ink4/Arf* sobre los niveles de glucosa e insulina plasmática y el peso corporal. (A) Análisis de los niveles de glucosa plasmática. **(B)** Análisis de los niveles de insulina plasmática. **(C)** Análisis del peso corporal. Los estudios se llevaron a cabo en ratones ayunados 15 horas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza unidireccional.

2.1.3. Una copia extra del locus *Ink4/Arf* no produce cambios en el metabolismo lipídico

Una de las características de los pacientes con alteraciones en el metabolismo glucémico es cambios en los niveles de c-Total y de c-HDL (Zambon et al., 2009). Sin embargo, el análisis de los niveles plasmáticos de c-Total y c-HDL no mostró diferencias entre los ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* a ninguna edad. **(Figura 48A,B)**.

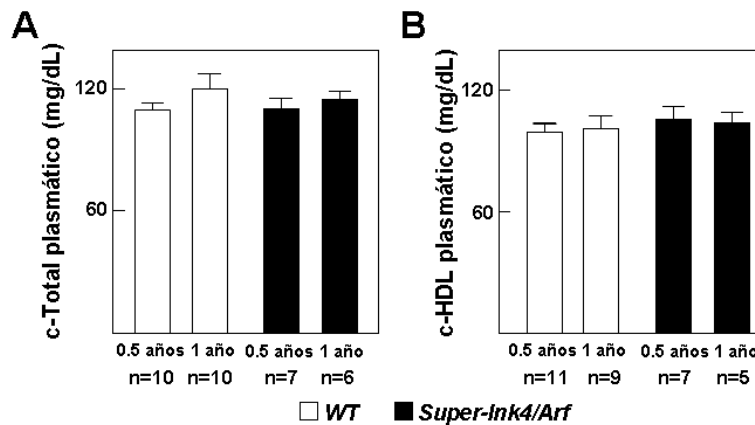


Figura 48. Efecto de la edad y del aumento de la dosis de *Ink4/Arf* en los niveles plasmáticos de colesterol. Niveles plasmáticos de colesterol total (c-Total) (A) y colesterol HDL (c-HDL) (B) en ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de las edades indicadas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza unidireccional.

2.1.4. Una copia extra del locus *Ink4/Arf* previene la intolerancia a la glucosa asociada al envejecimiento

Habiéndose observado diferencias en la glucosa e insulina basal entre los ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* se investigó la tolerancia a la glucosa mediante TTG en ratones ayunados. La tolerancia a la glucosa, medida con el parámetro $AUC_{glucosa}$, no mostró diferencias significativas entre ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* a los 0.5 años de edad (**Figura 49A, izquierda**). Por el contrario, la tolerancia ($AUC_{glucosa}$) en ratones *WT* de 1 año de edad fue significativamente mayor con respecto a los ratones *Super-Ink4/Arf* de la misma edad (**Figura 49A, derecha**). Además, el $AUC_{glucosa}$ aumentó significativamente durante el envejecimiento de ratones *WT* pero no en ratones *Super-Ink4/Arf* (**Figura 49A**). El análisis de la secreción de insulina estimulada por glucosa durante el TTG, medida como el $AUC_{insulina}$, tampoco mostró diferencias entre ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 0.5 años de edad (**Figura 49B, izquierda**), pero sí se observó un aumento significativo del $AUC_{insulina}$ en los ratones *WT* de 1 año con respecto a los ratones *Super-Ink4/Arf* de la misma edad (**Figura 49B, derecha**). Además, la secreción de insulina durante el TTG aumentó significativamente de forma edad-dependiente en los ratones *WT* pero no en los ratones *Super-Ink4/Arf* (**Figura 49B**). Estos resultados demuestran que el incremento de la dosis génica de *Ink4/Arf* previene el desarrollo de alteraciones en el metabolismo de la glucosa asociados a la edad, como son la intolerancia a la glucosa y un aumento de la secreción de insulina estimulada por glucosa.

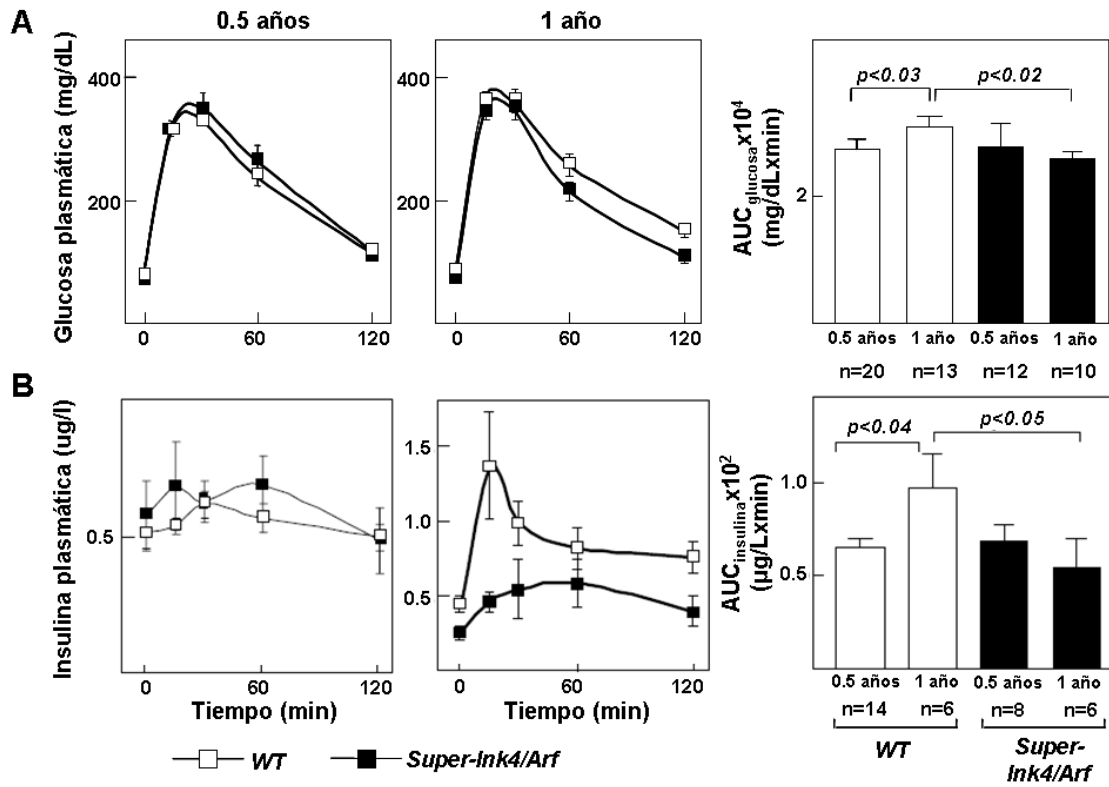


Figura 49. Análisis de la tolerancia a la glucosa mediante TTG en ratones WT y Super-Ink4/Arf. Niveles plasmáticos de glucosa (A) y de insulina (B) a los diferentes tiempos del TTG tras la inyección de glucosa de ratones de 0.5 y 1 año de edad. A la derecha de las gráficas de glucosa (A) e insulina (B) vs tiempo se muestran los valores de $AUC_{glucosa}$ y $AUC_{insulina}$ que reflejan la tolerancia a la glucosa y la insulina secretada respectivamente durante el test. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza unidireccional.

2.1.5. La presencia de una dosis extra del locus *Ink4/Arf* mejora la sensibilidad a la insulina

A continuación investigamos si las diferencias existentes eran debidas a alteraciones en la sensibilidad a insulina. Con esta finalidad se realizaron TTI en ratones de 0.5 y 1 año de edad de ambos genotipos. Los resultados demostraron un aumento en la desaparición de glucosa tras la inyección de insulina en ratones *Super-Ink4/Arf* en comparación con los ratones *WT* a los 0.5 ($p < 0.04$) y 1 ($p < 0.02$) año de edad, indicando mayor sensibilidad a la insulina en los ratones con una dosis extra del locus (**Figura 50A,B**). Por otro lado, se observó una pérdida de sensibilidad a la insulina dependiente de la edad en los ratones *WT* pero no en ratones *Super-Ink4/Arf* (**Figura 50**). Estos resultados sugieren que un aumento en la dosis génica del locus *Ink4/Arf* previene la pérdida en la sensibilidad a insulina asociada a la edad.

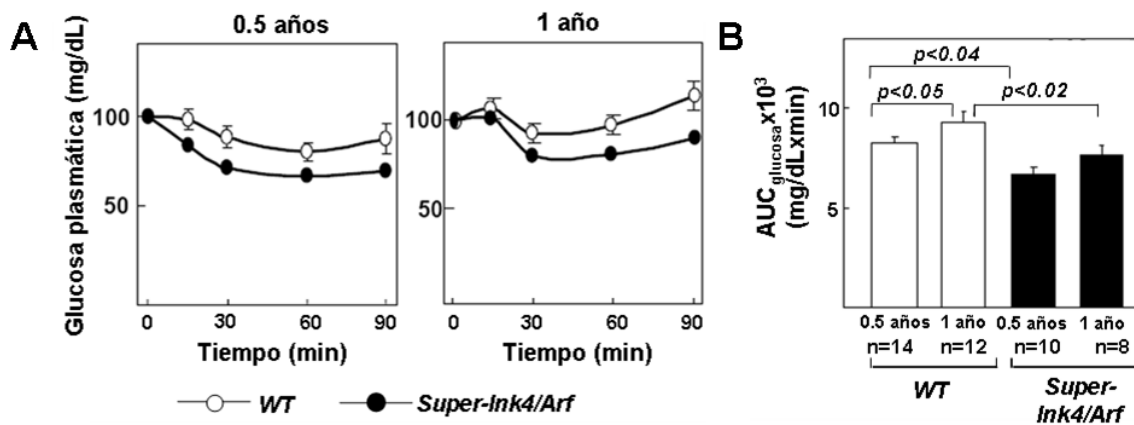


Figura 50. Análisis de la sensibilidad a insulina mediante TTI. (A) Niveles plasmáticos de glucosa vs tiempo tras la inyección de insulina en ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* a 0.5 y 1 año de edad. **(B)** Valores de los $AUC_{glucosa}$ del TTI de los ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* a 0.5 y 1 año de edad. El incremento en la dosis génica de *Ink4/Arf* disminuye el $AUC_{glucosa}$ del TTI indicando una mayor sensibilidad a insulina en ratones *Super-Ink4/Arf*. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza unidireccional.

2.1.6. Una dosis extra de *Ink4/Arf* aumenta la captación de glucosa en músculo esquelético

La insulina ejerce sus acciones mediante la activación de la vía de señalización del R-INS/IRS/PI3K/AKT, promoviendo así la translocación de los transportadores de glucosa GLUT desde el interior de la célula a la membrana plasmática y produciendo la consiguiente eliminación de glucosa del torrente sanguíneo (Biddinger and Kahn, 2006; Nandi et al., 2004). Dado que se observó un incremento de la sensibilidad a insulina en los ratones *Super-Ink4/Arf* comparado con ratones *WT* de 1 año de edad, se investigó la captación de la glucosa en músculo esquelético, uno de los tejidos periféricos más sensible a la hormona. Con este fin, se realizaron estudios de captación y disposición *in vivo* de la glucosa mediante técnicas de imagen PET, que utiliza un análogo no metabolizable de la glucosa de tal forma que se acumula en los tejidos, combinado con CT, que permite visualizar el tejido de interés. Se inyectó ^{18}F -FDG a ratones de 1 año de edad. Tras 60 minutos de captación, se analizó el músculo esquelético mediante imagen PET-CT (**Figura 51A**). La cuantificación del valor *standard* de captación (SUV) mostró un incremento, aunque no significativo, en la captación de ^{18}F -FDG en músculo esquelético de los ratones *Super-Ink4/Arf* en comparación con los ratones *WT* (**Figura 51B**, $p=0.079$). Además, se investigó la posible relación entre los niveles de glucosa en plasma y la captación muscular de glucosa. Los análisis de regresión demostraron una correlación positiva entre la captación de ^{18}F -FDG y los niveles de glucosa basal plasmática en ratones *Super-Ink4/Arf* pero no en los ratones *WT* (**Figura 51C**) sugiriendo mayor sensibilidad a los niveles de glucosa en los ratones con la dosis génica extra de *Ink4/Arf*.

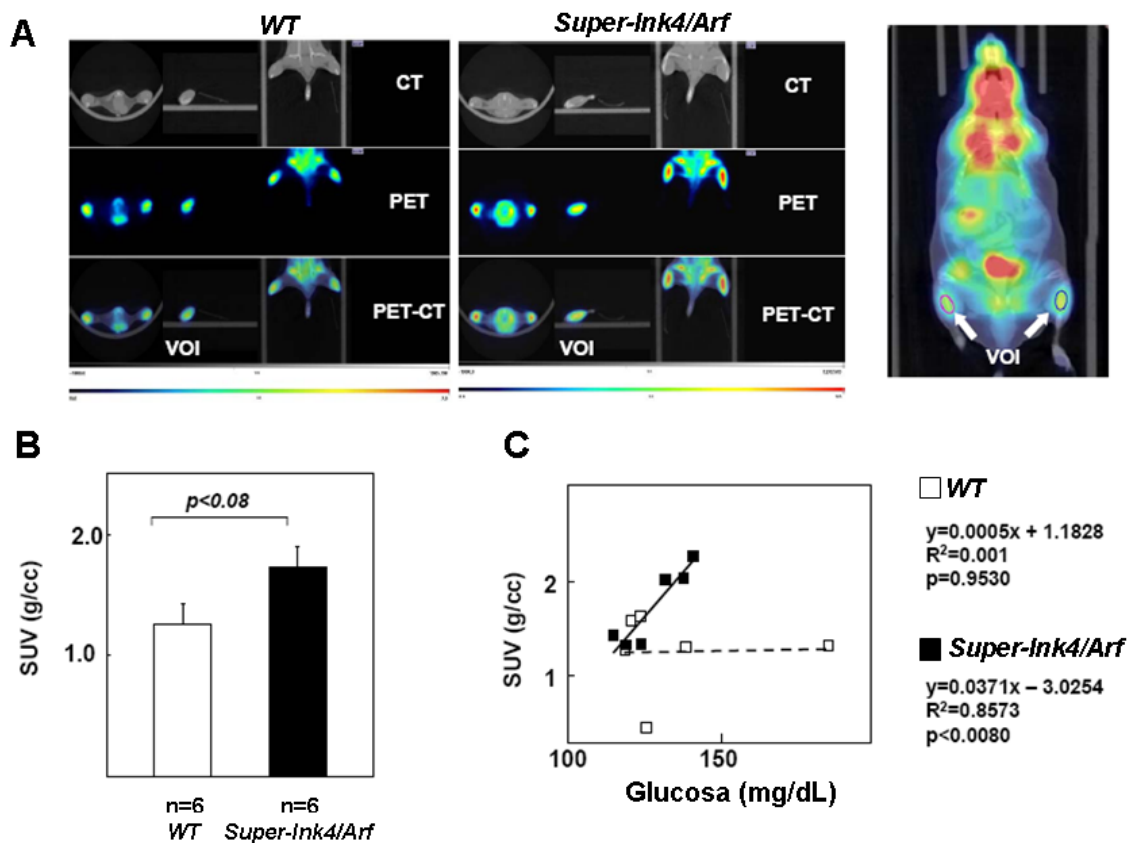


Figura 51. Efecto del incremento de la dosis génica de *Ink4/Arf* en la captación *in vivo* de ^{18}F -FDG en músculo esquelético. Análisis de la captación de ^{18}F -FDG en músculo esquelético de ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 1 año de edad mediante PET/CT (A) Imágenes representativas transaxiales de la mitad inferior del y de la captación de ^{18}F -FDG (Arriba: CT, en medio: PET, debajo: combinación PET/CT). La imagen a la derecha muestra la imagen PET/CT del cuerpo entero del ratón. Las flechas indican la zona delimitada como VOI en el músculo sóleo que se utilizó para los análisis. (B) Cuantificación de la captación de ^{18}F -FDG en el sóleo de los ratones. (C) Análisis de regresión de la captación de ^{18}F -FDG (SUV) en función de los niveles de glucosa plasmática de los mismos ratones. Cada punto representa un animal. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el test t-Student (B) y el F-test (C).

2.2. Estudio del papel del locus *Ink4/Arf* en la funcionalidad de las células β -pancreáticas en ratones *Super-Ink4/Arf*

2.2.1. El aumento de la dosis del locus *Ink4/Arf* no afecta ni al número de islotes pancreáticos ni al área ocupada por células β -pancreáticas

La pérdida de células β y la disminución de la masa de islotes pancreáticos contribuyen al desarrollo de la intolerancia a la glucosa dependiente de la edad y al desarrollo de DMT2 en humanos (Rhodes, 2005). Con la finalidad de investigar si las diferencias observadas entre ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* van acompañadas de cambios en la masa de los islotes pancreáticos, se determinó el número y el área de los islotes en ratones de 0.5 y 1 año de edad.

El número de islotes, identificados mediante inmunorreactividad a la insulina, no se vio afectado por la dosis génica extra de *Ink4/Arf* a ninguna edad (**Figura 52A**). Del mismo modo, el promedio del área ocupada por células β -pancreáticas fue similar en los ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 0.5 y 1 año de edad (**Figura 52B**). Estos resultados sugieren que el fenotipo observado a 1 año de edad no es producido por una alteración en la funcionalidad de la célula β -pancreática inducida por una dosis extra del locus *Ink4/Arf*.

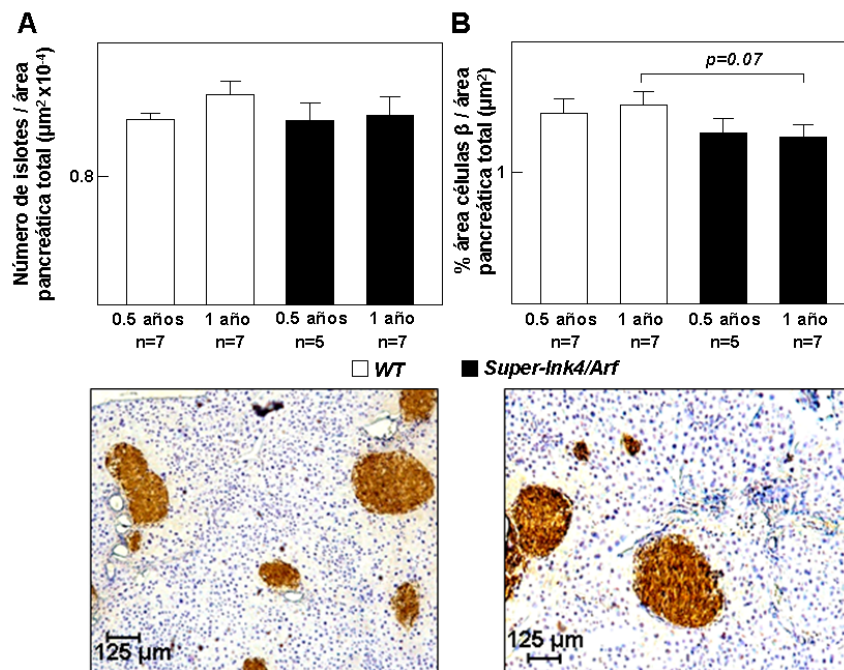


Figura 52. Análisis del número de islotes pancreáticos y del área ocupada por células β -pancreáticas en ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 0.5 y 1 año de edad. (A) Número de islotes en ratones por área pancreática total. (B) Área ocupada por células β -pancreáticas expresado como porcentaje de área positiva para insulina relativizada al área total del páncreas. Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica para insulina. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza unidireccional.

2.2.2. El aumento de la dosis de *Ink4/Arf* no afecta ni a la proliferación ni a la apoptosis de células β -pancreáticas

La proliferación celular y la apoptosis son dos de los mecanismos responsables del mantenimiento de la masa de células β en los islotes pancreáticos (Rhodes, 2005), procesos que además son regulados por el locus *Ink4/Arf* (Sherr, 2000). Para investigar el efecto de la dosis extra de *Ink4/Arf* en estos procesos se determinó la tasa proliferativa y la apoptosis utilizando, respectivamente, los marcadores Ki-67 y CL-caspasa-3 en los islotes pancreáticos de ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 0.5 y 1 año de edad. El análisis mediante inmunohistoquímica anti-Ki67 en islotes pancreáticos no mostró diferencias significativas en la tasa proliferativa de ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* a ninguna de las edades analizadas (**Figura 53A**). De forma similar, el análisis de la apoptosis tampoco mostró diferencias significativas entre ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* entre genotipos a ninguna edad (**Figura 53B**).

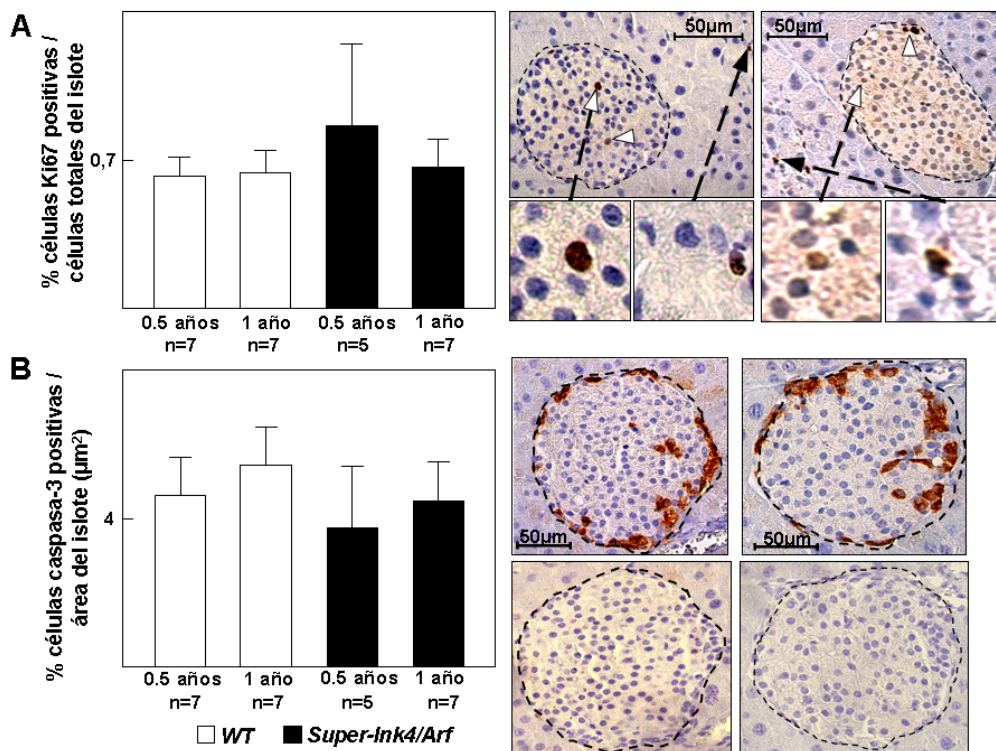


Figura 53. Análisis de la proliferación y de la apoptosis en páncreas. La proliferación (**A**) y la apoptosis (**B**) fueron analizadas mediante inmunohistoquímica anti-Ki67 y anti-caspasa-3, respectivamente. La proliferación se cuantificó como el porcentaje de células Ki67 positivas relativizado al número total de células del islote, mientras que la apoptosis se determinó como el área positiva para caspasa-3 relativizada al área del islote. Se muestran imágenes representativas de las dos inmunohistoquímicas. La línea discontinua delimita el islote pancreático y las flechas señalan las células positivas para Ki-67. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza unidireccional.

2.2.3. El aumento de la dosis de *Ink4/Arf* con la edad no se asocia a un aumento de p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} en células β -pancreáticas

A continuación realizamos estudios de inmunohistoquímica con el fin de investigar la expresión de p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} en islotes pancreáticos de ratones *Super-Ink4/Arf* y ratones *WT* de 1 año de edad. Consistente con los estudios de análisis de expresión génica y de expresión proteica en otros tejidos (**Figura 45**), el análisis de islotes pancreáticos no mostró diferencias significativas entre genotipos en ninguno de los casos (**Figura 54**).

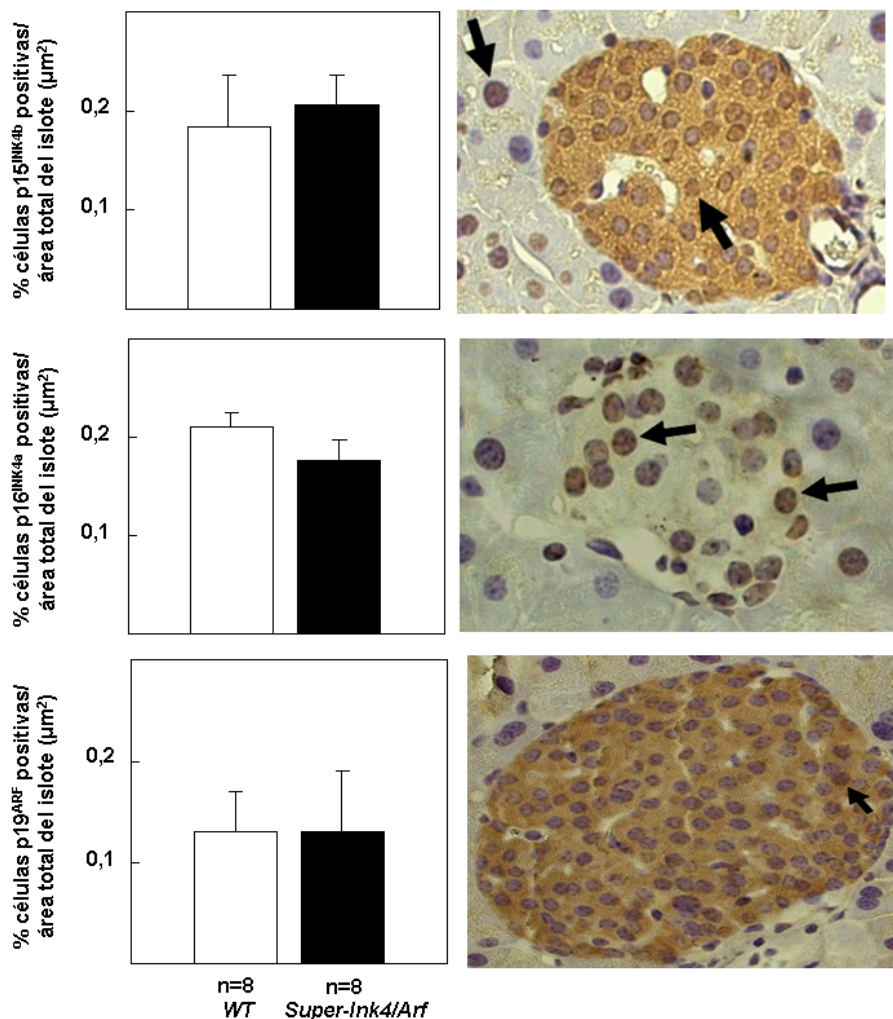


Figura 54. Análisis de la expresión de p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} en células β -pancreáticas. Porcentaje de células positivas para p15^{INK4b} (A), p16^{INK4a} (B) y p19^{ARF} (C) en islotes pancreáticos. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas relativizadas al área total del islote (en μm^2). Las imágenes mostradas son representativas para cada inmunohistoquímica. Las flechas señalan las células positivas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el test t-student.

2.3. Estudio del papel del locus Ink4/Arf en la señalización de la insulina en tejidos diana

2.3.1. Los ratones *Super-Ink4/Arf* presentan un incremento en la señalización por insulina en hígado

La inactivación o la señalización defectuosa mediada por la vía R-INS/IRS/AKT causa alteraciones en la homeostasis de la glucosa en una gran variedad de tejidos y conduce a estados de RI y DMT2 (Cho et al., 2001; Garofalo et al., 2003; Gonzalez-Navarro et al., 2007; Gunton et al., 2005; Manning and Cantley, 2007; Withers et al., 1998). Dado que los ratones *Super-Ink4/Arf* mostraron una mejora de la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a insulina y la consiguiente captación de la glucosa comparado con los ratones *WT*, se investigó la señalización celular mediada por IRS-PI3K-AKT en tejidos periféricos e hígado en los dos grupos de ratones. Con la finalidad de estudiar la activación de la vía *in vivo*, ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 1 año de edad ayunados durante 15 horas fueron estimulados con insulina y se sacrificaron a los 5 minutos para el análisis de la activación de la vía en los diferentes tejidos. Experimentos de co-inmunoprecipitación y posterior análisis mediante Western Blot en hígado mostraron una expresión reducida de las formas activadas de IRS1 (pTyr-IRS1) (**Figura 55A**) e IRS2 (p-Tyr-IRS2) (**Figura 55B**) inducidas por insulina en los ratones *WT* comparado con ratones *Super-Ink4/Arf*. La interacción de IRS2 con la proteína p85 α , la subunidad reguladora de PI3K, fue ligeramente menor en el hígado de ratones *WT* comparado con los ratones *Super-Ink4/Arf*, aunque las diferencias no fueron significativas (**Figura 55B**). Por el contrario, la interacción IRS1-p85 α fue similar en ambos grupos de ratones (**Figura 55A**).

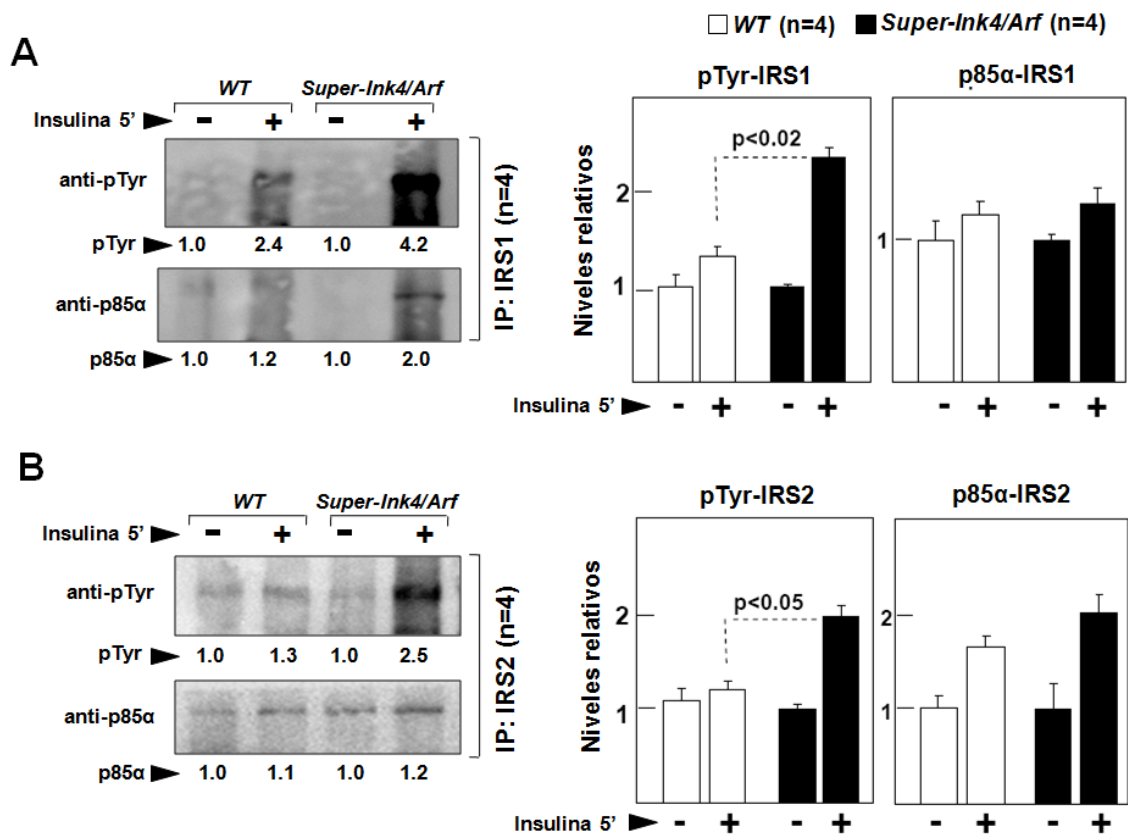


Figura 55. Análisis de la señalización de la insulina *in vivo* en ratones WT y *Super-Ink4/Arf* de 1 año de edad. Ratones ayunados durante 15 horas fueron estimulados vía hepática con insulina y sacrificados a los 5 minutos de estimulación. Los lisados hepáticos fueron sometidos a coimmunoprecipitación con anticuerpos anti-IRS1 (**A**) o anti-IRS2 (**B**). Para el análisis de la señalización de la insulina se determinaron mediante Western Blot los niveles proteicos de la subunidad reguladora de la PI3K, p85α, y las formas activadas por fosforilación en tirosina (pTyr) de IRS1 (pTyr-IRS1, **A**) o IRS2 (pTyr-IRS2, **B**). La cuantificación de los Western Blots (n=4) se realizó mediante densitometría. Se muestran blots representativos de las coimmunoprecipitaciones de los extractos proteicos hepáticos de ratones WT y *Super-Ink4/Arf* y los números debajo de los blots muestran las cuantificaciones relativizadas al ratón no estimulado para cada genotipo (=1.0).

Puesto que se observaron cambios en la activación de IRS2 e IRS1, se investigaron posibles diferencias en los niveles de proteína y ARN mediante Western Blot y qPCR. Estos estudios no mostraron diferencias significativas entre ratones WT y *Super-Ink4/Arf* de 1 año de edad (**Figura 56A,B**).

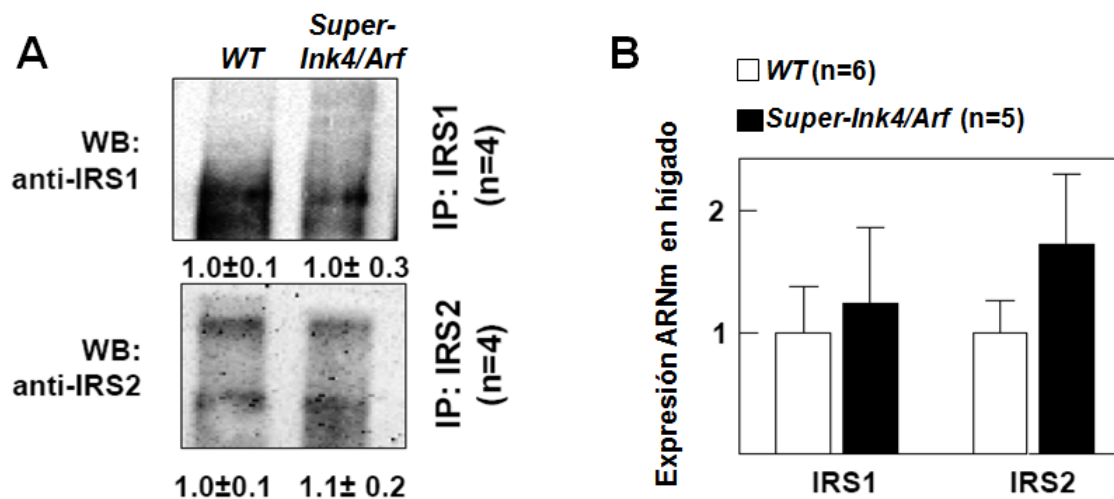


Figura 56. Análisis de expresión de IRS1 e IRS2 en hígado tras estimulación por insulina. El análisis de la expresión de IRS1 e IRS2 se realizó en hígado de ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* de 1 año de edad. **(A)** El lisado proteico fue inmunoprecipitado con anticuerpos anti-IRS1 y anti-IRS2 y analizado mediante Western Blot (WB). Las imágenes son representativas. Los números muestran la intensidad de banda determinada mediante densitometría relativizada al ratón *WT* (valor medio de 4 experimentos independientes). **(B)** Niveles de ARNm de IRS1 e IRS2 cuantificados mediante qPCR. Los niveles de ARNm fueron normalizados con respecto al control endógeno ciclofilina y relativizados a la expresión del ratón *WT* (=1).

2.3.2. Los ratones *Super-Ink4/Arf* presentan un incremento en la señalización por insulina en tejidos periféricos

Del mismo modo examinamos la activación de la vía AKT1/2 en tejidos periféricos de ratones de 1 año de edad usando anticuerpos fosfo-específicos para la detección de pAKT1/2. Consistente con los resultados obtenidos en hígado, los ratones *WT* mostraron una disminución en la expresión de p-AKT1/2 estimulada por insulina en músculo esquelético (**Figura 57A**) y en corazón (**Figura 57B**) comparado con la expresión en ratones *Super-Ink4/Arf* sin cambios de expresión en AKT total.

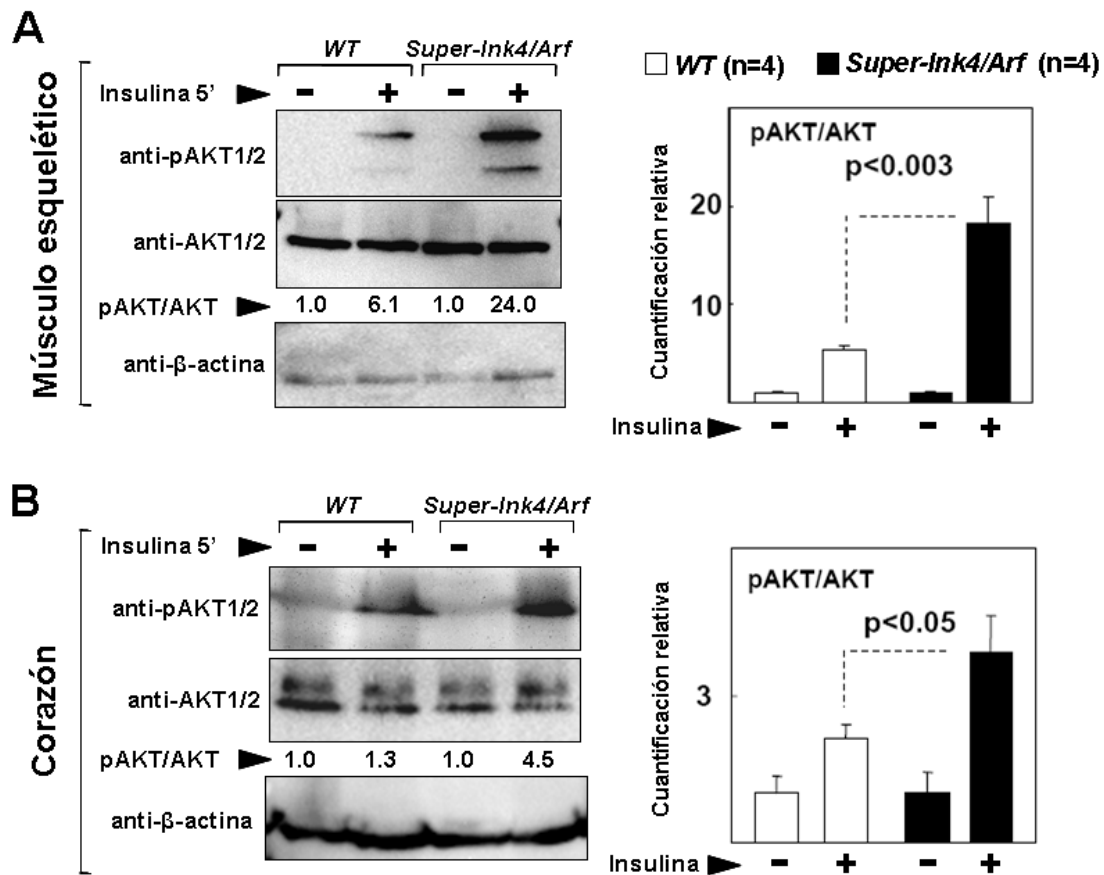


Figura 57. Análisis de la activación *in vivo* de los efectores intracelulares de la insulina AKT1/2 en músculo esquelético y corazón tras estimulación con insulina. Ratones ayunados durante 15 horas fueron estimulados vía hepática con insulina y sacrificados a los 5 minutos de la estimulación. Los lisados proteicos de músculo esquelético (**A**) y corazón (**B**) fueron sometidos a análisis mediante Western Blot usando anticuerpos anti-pAKT1/2, anti-AKT1/2 y β-actina. Las gráficas muestran la cuantificación de la intensidad de las bandas analizadas mediante densitometría de las formas activadas, pAKT, normalizadas con los niveles de AKT1/2 total y relativizadas a los niveles de los ratones no estimulados para cada genotipo. Se muestran Western Blots representativos para músculo esquelético y corazón de cada uno de los genotipos para cada una de las muestras analizadas.

Dado que la activación basal de la protein-quinasa JNK se ha asociado a una disminución en IRS1 en estados de DMT2 (Carlson et al., 2003) y de RI (Hirosumi et al., 2002), estudiamos su estado de activación en músculo esquelético y corazón de ratones *WT* y *Super-Ink4/Arf* analizando la forma fosforilada de la proteína. Los resultados no mostraron diferencias en la expresión de p-JNK en ratones de ambos genotipos (**Figura 58**).

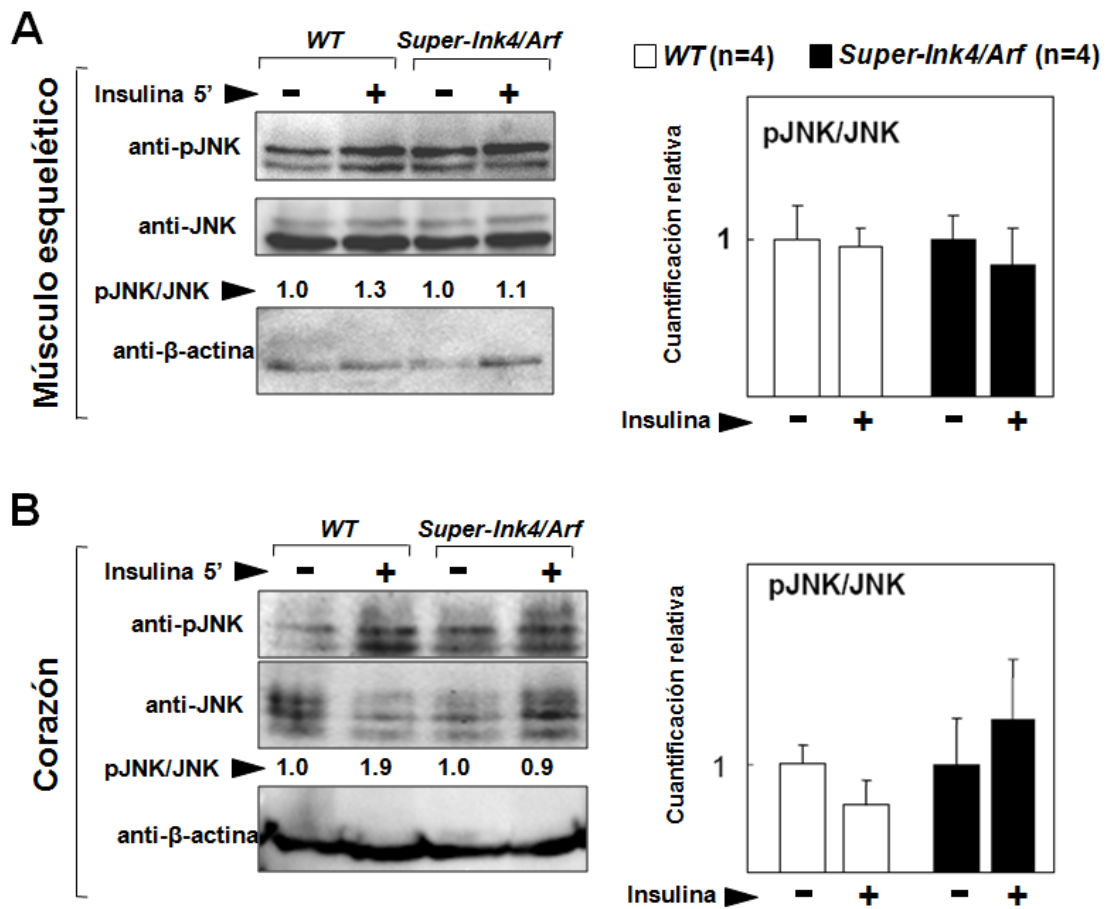


Figura 58. Análisis de la activación *in vivo* de JNK en músculo esquelético y corazón tras estimulación por insulina. Ratones ayunados durante 15 horas fueron estimulados vía hepática con insulina y sacrificados a los 5 minutos de la estimulación. Los lisados proteicos de músculo esquelético (**A**) y corazón (**B**) fueron sometidos a análisis mediante Western Blot usando anticuerpos anti-pJNK, anti-JNK y β -actina. La determinación de los niveles proteicos se realizó mediante densitometría de las bandas y las cuantificaciones muestran el ratio entre la proteína fosforilada, pJNK, y la proteína total JNK relativizados a los ratones no estimulados del mismo genotipo. Se muestran Western Blots representativos para músculo esquelético y corazón de cada uno de los genotipos para cada una de las muestras analizadas.

En conjunto, estos resultados indican que los ratones *Super-Ink4/Arf* están protegidos frente a la pérdida de sensibilidad a la insulina que se asocia al envejecimiento en ratones *WT*. Esta respuesta se asocia con una mejora en la señalización de la hormona en hígado y en tejidos periféricos, lo que ofrece una protección frente a las alteraciones de la homeostasis de la glucosa y de la insulina asociadas a la edad.

DISCUSIÓN

OBJETIVO 1. Estudio de los efectos de la disminución en la ruta de señalización por insulina a través del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2)

Los ratones deficientes en IRS2 desarrollan síntomas característicos de DMT2 y SM incluyendo RI, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hipertensión e hiperlipidemia moderada (Burks et al., 2000; Kubota et al., 2000; Withers et al., 1998). Recientemente tanto nosotros como otros grupos hemos demostrado que la inactivación total de IRS2 acelera la aterosclerosis en ratones *apoE*^{-/-} con hipercolesterolemia grave (Baumgartl et al., 2006; Gonzalez-Navarro et al., 2007).

En el presente estudio se demuestra que:

1. Comparado con pacientes SM-SI, pacientes con SM-RI presentan un aumento de varios marcadores de riesgo cardiovascular incluyendo IMC, circunferencia de la cintura, PAD, índice HOMA, niveles plasmáticos de insulina, LDLox y MMP9 y este riesgo se asocia a una disminución en la expresión en CMSPs de efectores de la señalización de la insulina como *Irs2* y *Akt2*.

2. Una reducción moderada en la expresión de *Irs2* acelera la aterosclerosis en ratones *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-} con características del SM y RI alimentados con dieta aterogénica. Además, el agravamiento de la aterosclerosis en estos ratones va acompañado de una mayor captación de Alexa Fluor 488-LDLac en macrófagos.

3. La reducción de la expresión de los genes *Akt2* y *Ras*, genes efectores de la vía de señalización por insulina, en tejido aórtico de ratones *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta aterogénica durante 2 meses se asocia con un aumento en la expresión de la citoquina proaterogénica *Mcp1* y con mayor desarrollo de la aterosclerosis.

4. Defectos en la vía de señalización IRS2/AKT e IRS2/ERK1/2, producidos por inactivación génica o inhibición farmacológica, inducen un aumento en la expresión de la citoquina proaterogénica *Mcp1*.

Estudios previos han demostrado una reducción en la expresión del R-INS, de *Irs2* y de *Akt2* en células β -pancreáticas en pacientes con DMT2 y con RI (Gunton et al., 2005). Sin embargo nuestro estudio es el primero en analizar la expresión de estas moléculas señalizadoras en CMSPs en plasma de pacientes SM-RI y SM-SI. Nuestros estudios demuestran una correlación entre el nivel del ARNm de *Irs2* y de *Akt2* en pacientes con SM (**Figura 31**) indicando que los niveles de expresión de ambos genes se regulan de manera similar en todos los pacientes con SM. Sin embargo sólo los

pacientes SM-RI mostraron una correlación inversa entre los niveles de ARNm de *Irs2* y *Akt2* y los niveles de insulina plasmática (**Figura 33A,C**) e índice HOMA (**Figura 33B,D**). Estos resultados indican que la hiperinsulinemia y la RI en humanos se asocian a una disminución en la expresión de *Irs2* y *Akt2* en CMSPs, las cuales juegan un papel importante en la patogénesis de la DMT2 y la aterosclerosis. No se observaron diferencias en los genes *Akt1* y *Akt3* entre pacientes SM-RI y SM-SI (**Figura 30C**). La expresión de *Irs1* que se encontró significativamente aumentada en pacientes SM-RI puede deberse, entre otros, a mecanismos compensatorios que merecen una mayor investigación (**Figura 30A**).

Tanto estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio como en otros demuestran que los ratones *apoE*^{-/-} con deficiencia total de IRS2 alimentados con dieta aterogénica presentan características de SM (dislipidemia grave, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, RI) y aterosclerosis acelerada (Baumgartl et al., 2006; Gonzalez-Navarro et al., 2007). Para investigar si la reducción moderada en la expresión de *Irs2* (comparable a la que se observa en CMSPs de pacientes con SM-RI) puede tener consecuencias patológicas en un modelo animal, generamos el ratón *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} el cual presenta inactivación de un único alelo de *Irs2*. En respuesta a una alimentación rica en grasas, estos ratones desarrollaron hipercolesterolemia grave (c-Total > 550 mg/dL) (**Figura 36B**), elevada intolerancia a la glucosa (**Figura 35B**) y una tendencia hacia la hiperinsulinemia (**Figura 34E**) en comparación con ratones control *apoE*^{-/-} con *Irs2* intacto. Este fenotipo de SM con características de RI en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} alimentados con dieta aterogénica se asocia con un agravamiento de la aterosclerosis aórtica (**Figura 37B**). No se observaron cambios en el contenido de la placa de ateroma en macrófagos, en cMLVs y en colágeno (**Figura 38**). Ninguna de las diferencias causadas por la ablación parcial de *Irs2* se observó cuando los ratones fueron alimentados con una dieta normal (c-Total <300 mg/dL), lo que sugiere que la reducción en la expresión de *Irs2* puede acelerar la aterosclerosis sólo cuando se combina con otras características del SM, como una elevada hipercolesterolemia. Nuestros resultados coinciden con otros estudios que demuestran que la RI causada por la ausencia del R-INS en ratones se asocia con un aumento de la aterosclerosis en condiciones de hipercolesterolemia severa (c-Total >700 mg/dL) causada por dieta aterogénica (Biddinger et al., 2008).

Por otro lado, observamos un aumento de la captación de LDLac (**Figura 39A**) coincidente con un aumento de la expresión de los receptores *scavenger* Sra y CD36

(Figura 39 B) en macrófagos del ratón *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* comparado con el control *apoE^{-/-}*. Resultados similares han sido previamente demostrados en macrófagos de ratones deficientes para el R-INS y en ratones *ob/ob*, los cuales exhiben características de SM y RI (Han et al., 2006; Liang et al., 2007). Por lo tanto un aumento de la captación por parte de los macrófagos de LDLmo a través de la regulación al alza de Sra y CD36 parece contribuir a la aterosclerosis acelerada por SM y RI en diferentes modelos murinos.

Como el ratón *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* alimentado con dieta aterogénica mostró ser un modelo adecuado para investigar cómo defectos en la señalización de la insulina promueven la aterosclerosis, realizamos experimentos de expresión en el cayado aórtico de estos ratones mediante arrays de qPCR con el fin de investigar las consecuencias de la reducción de *Irs2* sobre la expresión de 84 genes implicados en la señalización de insulina. Como era de esperar, el estudio de expresión génica confirmó una reducción significativa en la expresión de ARNm de *Irs2* en el cayado aórtico de ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* comparado con ratones control *apoE^{-/-}* alimentados con dieta aterogénica. Además, la expresión de *Akt2* y *Ras* fue significativamente menor en la aorta de ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* alimentados con dieta aterogénica, indicando una correlación entre la reducción moderada de la expresión de *Irs2* y una disminución en sus efectores intracelulares que median la señalización de la insulina **(Figura 40)**. Ambas vías de señalización dependientes de insulina IRS2/PI3K/AKT y IRS2/ERK1/2 están alteradas en los macrófagos de ratones diabéticos *db/db* y de ratones obesos *ob/ob* (Hartman et al., 2004; Liang et al., 2007) y en adipocitos humanos de pacientes con DMT2 (Ost et al., 2007). Por otro lado, cabe señalar que la inactivación de *Akt2* en ratón causa alteraciones en la homeostasis de la glucosa y sensibilidad a la insulina, produciendo RI y DMT2 (Cho et al., 2001; Garofalo et al., 2003). Por lo tanto, nuestros resultados extienden estos hallazgos al sistema cardiovascular sugiriendo que la reducción de *Akt2* y *Ras* en tejido aórtico es un mecanismo que contribuye al agravamiento de la aterosclerosis en ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* alimentados con dieta aterogénica.

Estudios previos han demostrado el papel proaterogénico de la citoquina proinflamatoria *Mcp1* (Bursill et al., 2004; Peters and Charo, 2001). Nuestros resultados apuntan a que un aumento de la expresión de *Mcp1* en aorta de ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* alimentados con dieta aterogénica puede contribuir al aceleramiento de la aterosclerosis en este modelo experimental de SM/DMT2. Además la expresión de

Mcp1 fue mayor en cMLVs y en macrófagos de ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* (**Figura 42**) y también aumentó tras la inhibición farmacológica de AKT2 o ERK1/2 en cMLVs de rata, estableciendo una relación causal entre disminución de la señalización mediada por IRS2/PI3K/AKT-ERK y la secreción de *Mcp1* (**Figura 43A**). De hecho, el aumento de la expresión de esta citoquina se ha observado en adipocitos de pacientes con RI (Sartipy and Loskutoff, 2003) y en plaquetas de pacientes diabéticos (Nomura et al., 2000). Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que la aterosclerosis acelerada en condiciones de SM se debe, al menos en parte, a defectos en las rutas de señalización IRS2-AKT2 y IRS2-RAS/ERK1/2 y al aumento de la expresión de *Mcp1* en diferentes tipos celulares involucrados en la aterosclerosis (cMLVs, macrófagos, plaquetas y adipocitos). Sin embargo, se necesitan estudios adicionales que establezcan firmemente las relaciones de causalidad entre estados de SM en humanos, aumento de la expresión de *Mcp1* y disfuncionalidad en las rutas de señalización IRS2-AKT2 y IRS2-RAS/ERK1/2.

En resumen, nuestros resultados en CMSPs de pacientes con SM-RI muestran una disminución de la expresión de *Irs2* y de su efector *Akt2* en comparación con pacientes con SM-SI, sugiriendo una relación mecanística entre la expresión reducida de *Irs2* y las enfermedades metabólicas en humanos. De hecho, la reducción moderada en la expresión de *Irs2* en ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* sometidos a dieta aterogénica es suficiente para producir síntomas similares al SM y acelerar la aterosclerosis. Nuestros estudios en tejido aórtico, en cultivos primarios de cMLVs y en macrófagos de estos ratones y sus controles correspondientes demuestran que la inactivación parcial de *Irs2* disminuye la ruta de señalización AKT2 y RAS/ERK1/2, lo que conduce a un aumento de la expresión de *Mcp1* y de los receptores CD36 y Sra y a un aumento en la captación de LDLac por parte de los macrófagos (**Figura 59**). Estos hallazgos ponen de relieve que defectos en las rutas de señalización dependientes de AKT2 y RAS/ERK1/2 son un mecanismo subyacente en la aterosclerosis acelerada en estados de SM y RI asociados a inactivación de *Irs2*.

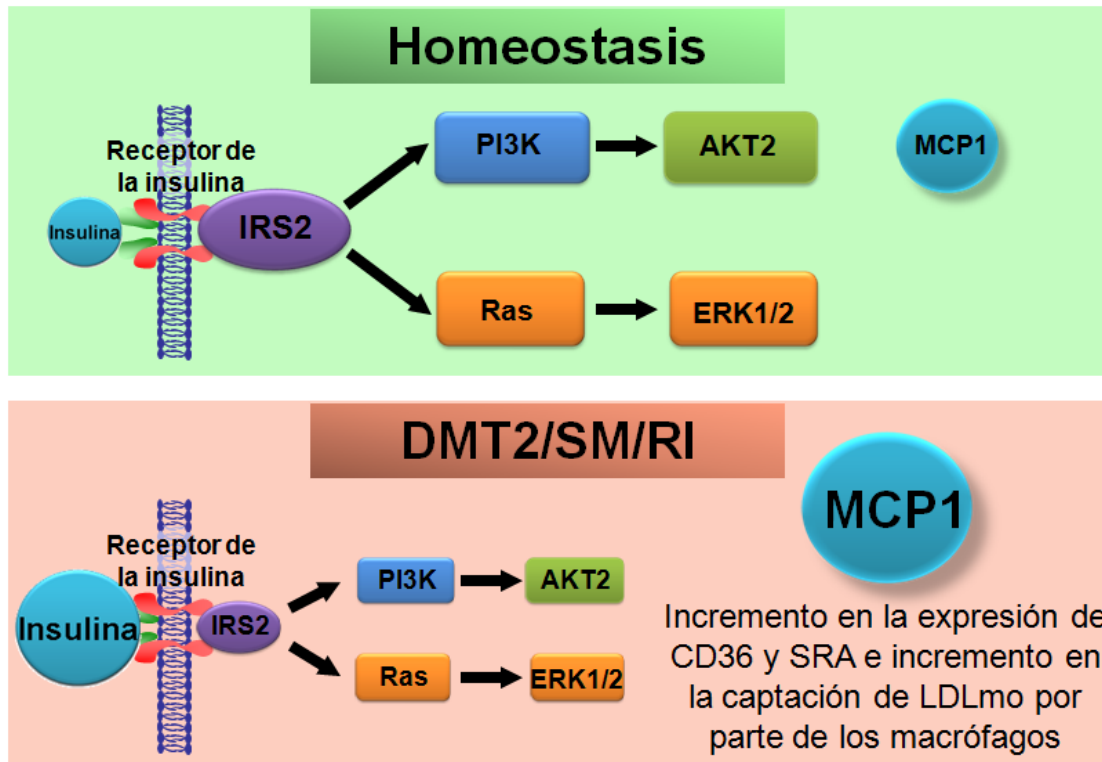


Figura 59. Mecanismos de la aterosclerosis acelerada en estados de SM y RI. En estados de homeostasis la insulina tras la unión y activación de su receptor, R-INS, desencadena la fosforilación de la proteína IRS2 que activa las vías de señalización de la insulina PI3K (AKT2) y MAPK (RAS/ERK1/2). En estados de DMT2/SM/RI hay una disminución en los niveles de IRS2 que se traducen en una disminución de la señalización mediada por AKT1/2 y RAS/ERK1/2. Esta señalización defectuosa se asocia con un aumento de la expresión de la citoquina proaterogénica *Mcp1* y un aumento de la expresión de los receptores CD36 y Sra en macrófagos que va acompañado de un incremento de la captación de LDLac contribuyendo al aceleramiento y a la progresión de la aterosclerosis.

OBJETIVO 2. Estudio del papel del locus *Ink4/Arf* en el desarrollo de resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa asociada a la edad

Estudios recientes de asociación genética a gran escala han asociado polimorfismos de base única en una región del cromosoma 9p21, cercanos al locus *Ink4/Arf*, con enfermedades características del envejecimiento, de gran impacto socio-económico y sanitario, como son las enfermedades coronarias, infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares y DMT2 (Consortium., 2007; Doria et al., 2008; Hamsten and Eriksson, 2008; Melzer et al., 2007; Saxena et al., 2007; Scott et al., 2007; Zeggini et al., 2007). Por ello es necesario definir las consecuencias funcionales de estas variantes genéticas y determinar si el locus *Ink4/Arf* juega un papel en el desarrollo de la ECV y de la DMT2 asociada al envejecimiento. En esta tesis doctoral se investigó el efecto de un incremento moderado en la expresión del locus *Ink4/Arf* en la homeostasis de la glucosa y de la insulina en condiciones fisiológicas normales de envejecimiento.

Nuestros resultados muestran que los ratones transgénicos *Super-Ink4/Arf*, con una copia extra del locus *Ink4/Arf*, están protegidos frente a las alteraciones en la homeostasis de la glucosa (aumento de glucemia (**Figura 47A**) e intolerancia a la glucosa (**Figura 49A**)) asociadas al envejecimiento. La ganancia de función del locus *Ink4/Arf* no se asoció con cambios en el número (**Figura 52A**), en el área media (**Figura 52B**), en la tasa proliferativa (**Figura 53A**) o en el porcentaje de apoptosis (**Figura 53B**) de los islotes pancreáticos. Asimismo, no se observaron cambios en el número de células positivas para p15^{INK4b}, p16^{INK4a} y p19^{ARF} en células β-pancreáticas (**Figura 54**). Sin embargo, una dosis extra del locus produjo un incremento en la activación de la vía de señalización IRS-PI3K-AKT estimulada por insulina en hígado (**Figura 55**), músculo esquelético (**Figura 57A**) y corazón (**Figura 57B**). Consistente con un aumento en la sensibilidad a la insulina y mejora en la señalización mediada por IRS y menores niveles plasmáticos de glucosa, los ratones *Super-Ink4/Arf* mostraron un aumento, aunque no significativo, en la captación de glucosa *in vivo* en músculo esquelético comparado con ratones *WT* (**Figura 51B**). Además, se observó una correlación positiva entre la captación de glucosa y los niveles basales de glucosa en ratones *Super-Ink4/Arf* pero no en ratones *WT* (**Figura 51C**), indicando que los ratones con el alelo extra de *Ink4/Arf* responden con mayor sensibilidad a los niveles de glucosa plasmáticos. En conjunto nuestros resultados sugieren que un aumento moderado de la función del locus *Ink4/Arf* previene las alteraciones del metabolismo

de la glucosa y la RI asociadas al envejecimiento mediante la mejora de la activación de la vía de señalización dependiente de insulina IRS-PI3K-AKT.

El envejecimiento se asocia a una mayor susceptibilidad a desarrollar DMT2 y otras enfermedades metabólicas (Hayflick, 2000; Rhodes, 2005) y con un incremento en la expresión del locus *Ink4/Arf* en una gran variedad de tejidos humanos y murinos (Kim and Sharpless, 2006; Krishnamurthy et al., 2004; Ressler et al., 2006; Satyanarayana and Rudolph, 2004; Zindy et al., 1997). Además de promover la senescencia de las células somáticas, la sobreexpresión de *Ink4/Arf* dependiente de la edad quizás contribuya al envejecimiento y a la enfermedad del organismo limitando el potencial regenerativo de las células madre (Krishnamurthy et al., 2004). En este sentido, la eliminación de células senescentes marcadas con p16^{INK4a} de forma selectiva mediante fármacos en el ratón transgénico BubR1 retrasa la aparición de enfermedades asociadas a la edad (Baker et al., 2011). Sin embargo, hay evidencias que muestran que *Ink4/Arf* puede provocar efectos beneficiosos. Así, los ratones *Super-Ink4/Arf* con una copia extra del locus *Ink4/Arf* muestran un incremento moderado en la expresión de p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y ARF en varios tejidos a edades avanzadas y son más resistentes al cáncer que los controles y, además, muestran una esperanza de vida y un envejecimiento normal (Matheu et al., 2004). Por otro lado, la presencia de dos copias del locus *Ink4/Arf* en ratones transgénicos, además de aumentar la resistencia al cáncer, mejora la esperanza de vida debido, probablemente, a un aumento en la quiescencia celular y a una disminución de la proliferación celular innecesaria (Matheu et al., 2009). También existen estudios que sugieren una función ateroprotectora del locus *Ink4/Arf*. En este sentido, tanto la inactivación génica de ARF en ratones deficientes en apoE (*apoE^{-/-}p19^{-/-}*) (Gonzalez-Navarro et al., 2010) como la inactivación selectiva en macrófagos del gen CDKN2A (que codifica para p16^{INK4a} y ARF) superimpuesta a la deficiencia global del receptor de las LDL (*CDKN2A^{-/-}LDLr^{-/-}*) (Kuo et al., 2011) agravan la aterosclerosis. Todos estos resultados proporcionan evidencias adicionales de que el locus *Ink4/Arf* ejerce un efecto beneficioso protegiendo tanto frente al cáncer como frente a las ECV y a la RI.

El envejecimiento en humanos y en ratones se asocia con una progresiva pérdida de la sensibilidad a la insulina y con la aparición de hiperinsulinemia (Araki et al., 1994; Barak et al., 2002; Rhodes, 2005; Withers et al., 1999). Además, el deterioro de la señalización a través de R-INS/IRS/AKT en diversos tejidos (incluyendo células β -pancreáticas, adipocitos, leucocitos o hepatocitos) conduce a estados de RI y DMT2

(Cho et al., 2001; Garofalo et al., 2003; Gonzalez-Navarro et al., 2007; Gunton et al., 2005; Manning and Cantley, 2007; Withers et al., 1999; Withers et al., 1998). De acuerdo con estos resultados, nuestros estudios muestran que ratones *WT* de 1 año de edad, a diferencia de los ratones *Super-Ink4/Arf* de la misma edad, presentan un descenso en la tolerancia a la glucosa asociada a la edad. La protección frente a la intolerancia a la glucosa en ratones *Super-Ink4/Arf* se explica, al menos en parte, mediante una mejora en la activación de la señalización IRS-PI3K-AKT inducida por insulina en hígado, músculo esquelético y corazón comparado con ratones control. El aumento de la señalización en ratones *Super-Ink4/Arf* va acompañado además de una tendencia al aumento de la captación de glucosa en músculo esquelético y de un descenso de los niveles plasmáticos de glucosa. Nuestros estudios sugieren que un incremento moderado de la función de *Ink4/Arf* puede ser una medida terapéutica en el tratamiento y la prevención de la aparición de la RI y de la alteración del metabolismo de hidratos de carbono asociados a la edad.

En la línea de nuestros resultados, se ha demostrado que el índice HOMA-RI en pacientes está modulado por variantes genéticas en *CDKN2B*, uno de los genes del locus *Ink4/Arf* (Ruchat et al., 2009). Sin embargo otros estudios sugieren que los polimorfismos de base única en la posición cromosómica 9p21, cercana al locus *Ink4/Arf*, se asocian a una disminución de la función de los islotes pancreáticos, produciendo una disminución en la secreción de insulina (Hribal et al., 2011; Stancakova et al., 2009), y no a diferencias en la RI (Hribal et al., 2011; Ruchat et al., 2009) y al IMC (Hotta et al., 2012). Nuestros resultados apuntan a que una expresión moderada del locus entero *Ink4/Arf* en ratones *Super-Ink4/Arf* no altera ni el número ni el área de los islotes o su funcionalidad durante el envejecimiento fisiológico sino que parece proteger frente a la intolerancia a la glucosa y la RI asociada a la edad. Estudios previos en ratones muestran que la ausencia de $p16^{INK4a}$ aumenta la proliferación y la supervivencia de los islotes de ratones tras la destrucción de las células β inducida por tratamiento con estreptozotocina. Consistentemente, la sobreexpresión de $p16^{INK4a}$ en ratones tratados con estreptozotocina previene la proliferación de los islotes, sugiriendo que el aumento de la expresión de $p16^{INK4a}$ puede limitar la capacidad regenerativa de las células β -pancreáticas (Krishnamurthy et al., 2006). Es importante señalar que, a diferencia de nuestro modelo, el tratamiento con estreptozotocina, que induce DM tipo 1, induce estimulación mitogénica aguda y niveles elevados de expresión de $p16^{INK4a}$, como ha sido demostrado durante la

regeneración tras daño agudo en una variedad de tejidos, como grasa, músculo esquelético, sistema hematopoyético, sistema nervioso y páncreas endocrino (Baker et al., 2008; Janzen et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2006; Molofsky et al., 2006). Sin embargo, una expresión moderadamente aumentada de p16^{INK4a} a largo plazo puede tener consecuencias diferentes en modelos no agudos, como en los estudios presentados en esta memoria. El efecto protector observado en los ratones *Super-Ink4/Arf* sin afectar al número de islotes, área de la célula β -pancreática o funcionalidad durante el envejecimiento fisiológico no son los primeros en indicar que reguladores del ciclo celular pueden ejercer funciones adicionales al papel que desempeñan en el ciclo celular. Así, Kir6.2, un componente de canales K-ATP que promueven la secreción de insulina en células β , está regulado directamente por E2F1, indicando que este factor de transcripción ejerce un papel adicional al de modulador del ciclo celular (Annicotte et al., 2009). Estos resultados sugieren que las vías *Ink4/Arf* y CDK4–pRB–E2F1 regulan la homeostasis de la glucosa sin afectar a la proliferación de las células β -pancreáticas. Para determinar las contribuciones específicas de p16^{INK4a}, p19^{ARF} y p15^{INK4b} del locus *Ink4/Arf* en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina, así como en la funcionalidad de los islotes pancreáticos durante el envejecimiento, son necesarios estudios adicionales de pérdida de función y manipulaciones genéticas específicas de tejido en modelos animales.

CONCLUSIONES

1. El riesgo aumentado de padecer enfermedad cardiovascular en pacientes con síndrome metabólico (SM) y resistencia a insulina se asocia con niveles inferiores de expresión de *Irs2* y *Akt2* en leucocitos circulantes en comparación con pacientes con síndrome metabólico sensibles a insulina.
2. En leucocitos circulantes de pacientes con SM, los niveles de expresión de *Irs2* y *Akt2* se correlacionan positivamente independientemente del grado de sensibilidad a insulina, mientras que la expresión de *Irs2* y de *Akt2* en estas células se correlaciona inversamente con los niveles de insulina plasmática e índice HOMA en pacientes con SM y resistencia a insulina, pero no en los pacientes con SM sensibles a insulina.
3. Comparado con ratones hipercolesterolémicos deficientes en apolipoproteína E con el gen *Irs2* intacto (*apoE*^{-/-}), los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} con un alelo de *Irs2* inactivado presentan características del SM y de la RI, como son la intolerancia a la glucosa y una leve hiperinsulinemia.
4. Una reducción moderada en la expresión de *Irs2* en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} provoca un aceleramiento de la arteriosclerosis en comparación con controles *apoE*^{-/-}, sin afectar ni a la composición de la placa de ateroma ni al grado de hipercolesterolemia.
5. El agravamiento de la arteriosclerosis debido a la inactivación parcial de *Irs2* se asocia con una disminución de la expresión de *Akt2* y *Ras* y un aumento de la citoquina pro-aterogénica *Mcp1* en aorta, así como con un aumento de la expresión de *Mcp1* y de receptores CD36 y Sra en macrófagos y de la captación de LDLs por estas células.
6. La inhibición de las vías de señalización IRS2/AKT o IRS2/ERK1/2 mediante tratamiento farmacológico provoca un aumento de la expresión de *Mcp1* en células de músculo liso vascular.
7. Una copia extra del locus *Ink4/Arf* en ratones transgénicos protege frente a alteraciones del metabolismo de la glucosa asociadas al envejecimiento, tales como el desarrollo de intolerancia a la glucosa y pérdida de la sensibilidad a la insulina.

8. El aumento de sensibilidad a la glucosa en ratones con una dosis extra del locus *Ink4/Arf* se asocia a una mayor capacidad de captación de glucosa en músculo esquelético, parámetro que se correlaciona positivamente con los niveles basales de glucosa en plasma.
9. Una dosis extra del locus *Ink4/Arf* mejora la señalización de la insulina mediada por IRS-PI3K-AKT en hígado, músculo esquelético y corazón.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Adiels, M., Olofsson, S.O., Taskinen, M.R., and Boren, J. (2008). Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1225-1236.
- Alani, R.M., Young, A.Z., and Shifflett, C.B. (2001). Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7812-7816.
- Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.C., James, W.P., Loria, C.M., and Smith, S.C., Jr. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640-1645.
- Ameyar-Zazoua, M., Wisniewska, M.B., Bakiri, L., Wagner, E.F., Yaniv, M., and Weitzman, J.B. (2005). AP-1 dimers regulate transcription of the p14/p19ARF tumor suppressor gene. *Oncogene* 24, 2298-2306.
- Annicotte, J.S., Blanchet, E., Chavey, C., Iankova, I., Costes, S., Assou, S., Teyssier, J., Dalle, S., Sardet, C., and Fajas, L. (2009). The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nature cell biology* 11, 1017-1023.
- Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.E., Bruning, J.C., Haag, B., 3rd, Johnson, R.S., and Kahn, C.R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372, 186-190.
- Asano, T., Fujishiro, M., Kushiya, A., Nakatsu, Y., Yoneda, M., Kamata, H., and Sakoda, H. (2007). Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation on insulin action and its alteration in diabetic conditions. *Biol Pharm Bull* 30, 1610-1616.
- Askari, B., Renard, C.B., and Bornfeldt, K.E. (2002). Regulation of smooth muscle cell accumulation in diabetes-accelerated atherosclerosis. *Histology and histopathology* 17, 1317-1328.
- Averill, M.M., and Bornfeldt, K.E. (2009). Lipids versus glucose in inflammation and the pathogenesis of macrovascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep* 9, 18-25.
- Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182, 31-48.
- Baker, D.J., Perez-Terzic, C., Jin, F., Pitel, K., Niederlander, N.J., Jeganathan, K., Yamada, S., Reyes, S., Rowe, L., Hiddinga, H.J., *et al.* (2008). Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nature cell biology* 10, 825-836.
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232-236.
- Balcerzyk M, Kontaxakis G, Delgado M, Garcia-Garcia I, Correcher C, Gonzalez aj, g.A., Rubio JL, Benlloch JM, and Pozo MA (2009). Initial performance evaluation of a high resolution Albira small animal positron emission tomography scanner with monolithic crystals and depth-of-interaction encoding from a user's perspective. *Meas Sci Technol* 20, 6.
- Bansilal, S., Farkouh, M.E., and Fuster, V. (2007). Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 99, 6B-14B.

- Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E.S., Nelson, M.C., Olefsky, J.M., Boland, R., and Evans, R.M. (2002). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 303-308.
- Barter, P.J., Baker, P.W., and Rye, K.A. (2002). Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipidol* *13*, 285-288.
- Barter, P.J., Nicholls, S., Rye, K.A., Anantharamaiah, G.M., Navab, M., and Fogelman, A.M. (2004). Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* *95*, 764-772.
- Baumgartl, J., Baudler, S., Scherner, M., Babaev, V., Makowski, L., Suttles, J., McDuffie, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Fazio, S., *et al.* (2006). Myeloid lineage cell-restricted insulin resistance protects apolipoproteinE-deficient mice against atherosclerosis. *Cell Metab* *3*, 247-256.
- Beckman, J.A., Creager, M.A., and Libby, P. (2002). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Jama* *287*, 2570-2581.
- Berger, J.H., and Bardeesy, N. (2007). Modeling INK4/ARF tumor suppression in the mouse. *Curr Mol Med* *7*, 63-75.
- Bertomeu, V., and Castillo-Castillo, J. (2008). Situación de la enfermedad cardiovascular en España. Del riesgo a la enfermedad. *Rev Esp Cardiología* *08*, 2-9.
- Biddinger, S.B., Hernandez-Ono, A., Rask-Madsen, C., Haas, J.T., Aleman, J.O., Suzuki, R., Scapa, E.F., Agarwal, C., Carey, M.C., Stephanopoulos, G., *et al.* (2008). Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab* *7*, 125-134.
- Biddinger, S.B., and Kahn, C.R. (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol* *68*, 123-158.
- Bjornholm, M., He, A.R., Attersand, A., Lake, S., Liu, S.C., Lienhard, G.E., Taylor, S., Arner, P., and Zierath, J.R. (2002). Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia* *45*, 1697-1702.
- Bornfeldt, K.E., and Tabas, I. (2011). Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab* *14*, 575-585.
- Boyle, J.J., Weissberg, P.L., and Bennett, M.R. (2003). Tumor necrosis factor-alpha promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *23*, 1553-1558.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.
- Breslow, J.L. (1996). Mouse models of atherosclerosis. *Science* *272*, 685-688.
- Broadbent, H.M., Peden, J.F., Lorkowski, S., Goel, A., Ongen, H., Green, F., Clarke, R., Collins, R., Franzosi, M.G., Tognoni, G., *et al.* (2008). Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet* *17*, 806-814.
- Bulavin, D.V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L.A., Anderson, C.W., Appella, E., and Fornace, A.J., Jr. (2004). Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* *36*, 343-350.

- Burd, C.E., Jeck, W.R., Liu, Y., Sanoff, H.K., Wang, Z., and Sharpless, N.E. (2010). Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet* 6, e1001233.
- Burks, D.J., Font de Mora, J., Schubert, M., Withers, D.J., Myers, M.G., Towery, H.H., Altamuro, S.L., Flint, C.L., and White, M.F. (2000). IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 407, 377-382.
- Burks, D.J., and White, M.F. (2001). IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes* 50 *Suppl 1*, S140-145.
- Bursill, C.A., Channon, K.M., and Greaves, D.R. (2004). The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. *Curr Opin Lipidol* 15, 145-149.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110.
- Carlson, C.J., Koterski, S., Sciotti, R.J., Pocard, G.B., and Rondinone, C.M. (2003). Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes* 52, 634-641.
- Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223-233.
- Conget, I. (2002). Diagnosis, Classification and Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Rev Esp Cardiol* 55, 528-535.
- Consortium., W.T.C.C. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-678.
- Cugino, D., Gianfagna, F., Santimone, I., de Gaetano, G., Donati, M.B., Iacoviello, L., and Di Castelnuovo, A. (2011). Type 2 diabetes and polymorphisms on chromosome 9p21: A meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.
- Cunnington, M.S., and Keavney, B. (2011). Genetic mechanisms mediating atherosclerosis susceptibility at the chromosome 9p21 locus. *Curr Atheroscler Rep* 13, 193-201.
- Chang, L., Chiang, S.H., and Saltiel, A.R. (2004). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 10, 65-71.
- Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. (2005). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121, 1071-1083.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and Birnbaum, M.J. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science (New York, NY)* 292, 1728-1731.
- Debniak, T., Gorski, B., Huzarski, T., Byrski, T., Cybulski, C., Mackiewicz, A., Gozdecka-Grodecka, S., Gronwald, J., Kowalska, E., Haus, O., *et al.* (2005). A common variant of CDKN2A (p16) predisposes to breast cancer. *J Med Genet* 42, 763-765.
- Demer, L.L., and Tintut, Y. (2003). Mineral exploration: search for the mechanism of vascular calcification and beyond: the 2003 Jeffrey M. Hoeg Award lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1739-1743.
- Doria, A., Wojcik, J., Xu, R., Gervino, E.V., Hauser, T.H., Johnstone, M.T., Nolan, D., Hu, F.B., and Warram, J.H. (2008). Interaction between poor glycemic control

- and 9p21 locus on risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Jama* 300, 2389-2397.
- Duesing, K., Fatemifar, G., Charpentier, G., Marre, M., Tichet, J., Hercberg, S., Balkau, B., Froguel, P., and Gibson, F. (2008). Strong association of common variants in the CDKN2A/CDKN2B region with type 2 diabetes in French Europids. *Diabetologia* 51, 821-826.
- Dulic, V., Lees, E., and Reed, S.I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257, 1958-1961.
- Elliott, M.J., Dong, Y.B., Yang, H., and McMasters, K.M. (2001). E2F-1 up-regulates c-Myc and p14(ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 7, 3590-3597.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898.
- Fantin, V.R., Lavan, B.E., Wang, Q., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Keller, S.R., and Lienhard, G.E. (1999). Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology* 140, 1329-1337.
- Folkersen, L., Kyriakou, T., Goel, A., Peden, J., Malarstig, A., Paulsson-Berne, G., Hamsten, A., Hugh, W., Franco-Cereceda, A., Gabrielsen, A., *et al.* (2009). Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants. *PLoS One* 4, e7677.
- Furuhashi, M., Tuncman, G., Gorgun, C.Z., Makowski, L., Atsumi, G., Vaillancourt, E., Kono, K., Babaev, V.R., Fazio, S., Linton, M.F., *et al.* (2007). Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447, 959-965.
- Fuster, J.J., Fernandez, P., Gonzalez-Navarro, H., Silvestre, C., Nabah, Y.N., and Andres, V. (2010). Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovasc Res* 86, 254-264.
- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., and Chesebro, J.H. (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326, 242-250.
- Fuster, V., Moreno, P.R., Fayad, Z.A., Corti, R., and Badimon, J.J. (2005). Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 46, 937-954.
- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., *et al.* (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112, 197-208.
- Gayther, S.A., Song, H., Ramus, S.J., Kjaer, S.K., Whittemore, A.S., Quaye, L., Tyrer, J., Shadforth, D., Hogdall, E., Hogdall, C., *et al.* (2007). Tagging single nucleotide polymorphisms in cell cycle control genes and susceptibility to invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 67, 3027-3035.
- Gerstein, H.C., and Yusuf, S. (1996). Dysglycaemia and risk of cardiovascular disease. *Lancet* 347, 949-950.

- Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 667-677.
- Ginsberg, H.N., and MacCallum, P.R. (2009). The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J Cardiometab Syndr* 4, 113-119.
- Ginsberg, H.N., Zhang, Y.L., and Hernandez-Ono, A. (2006). Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 1, 41S-49S.
- Glass, C.K., and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104, 503-516.
- Gonzalez-Navarro, H., Abu Nabah, Y.N., Vinue, A., Andres-Manzano, M.J., Collado, M., Serrano, M., and Andres, V. (2010). p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 55, 2258-2268.
- Gonzalez-Navarro, H., Nong, Z., Amar, M.J., Shamburek, R.D., Najib-Fruchart, J., Paigen, B.J., Brewer, H.B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (2004). The ligand-binding function of hepatic lipase modulates the development of atherosclerosis in transgenic mice. *J Biol Chem* 279, 45312-45321.
- Gonzalez-Navarro, H., Vila-Caballer, M., Pastor, M.F., Vinue, A., White, M.F., Burks, D., and Andres, V. (2007). Plasma insulin levels predict the development of atherosclerosis when IRS2 deficiency is combined with severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-null mice. *Front Biosci* 12, 2291-2298.
- Gonzalez-Navarro, H., Vinue, A., Vila-Caballer, M., Fortuno, A., Beloqui, O., Zalba, G., Burks, D., Diez, J., and Andres, V. (2008). Molecular mechanisms of atherosclerosis in metabolic syndrome: role of reduced IRS2-dependent signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2187-2194.
- Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Daniels, S.R., Donato, K.A., Eckel, R.H., Franklin, B.A., Gordon, D.J., Krauss, R.M., Savage, P.J., Smith, S.C., Jr., *et al.* (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112, 2735-2752.
- Gunton, J.E., Kulkarni, R.N., Yim, S., Okada, T., Hawthorne, W.J., Tseng, Y.H., Roberson, R.S., Ricordi, C., O'Connell, P.J., Gonzalez, F.J., *et al.* (2005). Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122, 337-349.
- Hamsten, A., and Eriksson, P. (2008). Identifying the susceptibility genes for coronary artery disease: from hyperbole through doubt to cautious optimism. *J Intern Med* 263, 538-552.
- Han, S., Liang, C.P., DeVries-Seimon, T., Ranalletta, M., Welch, C.L., Collins-Fletcher, K., Accili, D., Tabas, I., and Tall, A.R. (2006). Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions. *Cell Metab* 3, 257-266.
- Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
- Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, E65-67.

- Hartman, M.E., O'Connor, J.C., Godbout, J.P., Minor, K.D., Mazzocco, V.R., and Freund, G.G. (2004). Insulin receptor substrate-2-dependent interleukin-4 signaling in macrophages is impaired in two models of type 2 diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279, 28045-28050.
- Hayflick, L. (2000). New approaches to old age. *Nature* 403, 365.
- Healy, J., Belanger, H., Beaulieu, P., Lariviere, M., Labuda, D., and Sinnett, D. (2007). Promoter SNPs in G1/S checkpoint regulators and their impact on the susceptibility to childhood leukemia. *Blood* 109, 683-692.
- Helgadottir, A., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Gretarsdottir, S., Blondal, T., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Baker, A., Palsson, A., *et al.* (2007). A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 316, 1491-1493.
- Hiebert, S.W., Packham, G., Strom, D.K., Haffner, R., Oren, M., Zambetti, G., and Cleveland, J.L. (1995). E2F-1:DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* 15, 6864-6874.
- Hirosimi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.
- Holdt, L.M., Beutner, F., Scholz, M., Gielen, S., Gabel, G., Bergert, H., Schuler, G., Thiery, J., and Teupser, D. (2010). ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 620-627.
- Hossain, P., Kavar, B., and El Nahas, M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med* 356, 213-215.
- Hotta, K., Kitamoto, A., Kitamoto, T., Mizusawa, S., Teranishi, H., So, R., Matsuo, T., Nakata, Y., Hyogo, H., Ochi, H., *et al.* (2012). Association between type 2 diabetes genetic susceptibility loci and visceral and subcutaneous fat area as determined by computed tomography. *Journal of human genetics* 57, 305-310.
- Hribal, M.L., Presta, I., Procopio, T., Marini, M.A., Stancakova, A., Kuusisto, J., Andreozzi, F., Hammarstedt, A., Jansson, P.A., Grarup, N., *et al.* (2011). Glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin release in European non-diabetic carriers of a polymorphism upstream of CDKN2A and CDKN2B. *Diabetologia* 54, 795-802.
- Inoue, K., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1999). Induction of ARF tumor suppressor gene expression and cell cycle arrest by transcription factor DMP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3993-3998.
- Jacobs, J.J., Keblusek, P., Robanus-Maandag, E., Kristel, P., Lingbeek, M., Nederlof, P.M., van Welsem, T., van de Vijver, M.J., Koh, E.Y., Daley, G.Q., *et al.* (2000). Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet* 26, 291-299.
- Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H.E., Saito, Y., Waring, M.T., Dombkowski, D.M., Cheng, T., DePinho, R.A., Sharpless, N.E., and Scadden, D.T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 443, 421-426.
- Jiang, P., Stone, S., Wagner, R., Wang, S., Dayananth, P., Kozak, C.A., Wold, B., and Kamb, A. (1995). Comparative analysis of Homo sapiens and Mus musculus

- cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor genes p16 (MTS1) and p15 (MTS2). *J Mol Evol* 41, 795-802.
- Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitgian, S.V., Stockert, E., Day, R.S., 3rd, Johnson, B.E., and Skolnick, M.H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.
- Kanter, J.E., Johansson, F., LeBoeuf, R.C., and Bornfeldt, K.E. (2007). Do glucose and lipids exert independent effects on atherosclerotic lesion initiation or progression to advanced plaques? *Circ Res* 100, 769-781.
- Kathiresan, S., Voight, B.F., Purcell, S., Musunuru, K., Ardissino, D., Mannucci, P.M., Anand, S., Engert, J.C., Samani, N.J., Schunkert, H., *et al.* (2009). Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet* 41, 334-341.
- Kido, Y., Burks, D.J., Withers, D., Bruning, J.C., Kahn, C.R., White, M.F., and 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, B., Cheng, H.L., Margolis, B., and Feldman, E.L. (1998). Insulin receptor substrate 2 and Shc play different roles in insulin-like growth factor I signaling. *J Biol Chem* 273, 34543-34550.
- Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127, 265-275.
- Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., and Roberts, J.M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257, 1689-1694.
- Krishnamurthy, J., Ramsey, M.R., Ligon, K.L., Torrice, C., Koh, A., Bonner-Weir, S., and Sharpless, N.E. (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 443, 453-457.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114, 1299-1307.
- Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., Tsubamoto, Y., Komeda, K., Nakano, R., Miki, H., *et al.* (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49, 1880-1889.
- Kubota, T., Kubota, N., Moroi, M., Terauchi, Y., Kobayashi, T., Kamata, K., Suzuki, R., Tobe, K., Namiki, A., Aizawa, S., *et al.* (2003). Lack of insulin receptor substrate-2 causes progressive neointima formation in response to vessel injury. *Circulation* 107, 3073-3080.
- Kuiper, J., van Puijvelde, G.H., van Wanrooij, E.J., van Es, T., Habets, K., Hauer, A.D., and van den Berkel, T.J. (2007). Immunomodulation of the inflammatory response in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 18, 521-526.
- Kumar, R., Smeds, J., Berggren, P., Straume, O., Rozell, B.L., Akslen, L.A., and Hemminki, K. (2001). A single nucleotide polymorphism in the 3'untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *Int J Cancer* 95, 388-393.

- Kuo, C.L., Murphy, A.J., Sayers, S., Li, R., Yvan-Charvet, L., Davis, J.Z., Krishnamurthy, J., Liu, Y., Puig, O., Sharpless, N.E., *et al.* (2011). Cdkn2a is an atherosclerosis modifier locus that regulates monocyte/macrophage proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 2483-2492.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lammers, B., Zhao, Y., Hoekstra, M., Hildebrand, R.B., Ye, D., Meurs, I., Van Berkel, T.J., and Van Eck, M. (2011). Augmented atherogenesis in LDL receptor deficient mice lacking both macrophage ABCA1 and ApoE. *PLoS One* 6, e26095.
- Lavan, B.E., Fantin, V.R., Chang, E.T., Lane, W.S., Keller, S.R., and Lienhard, G.E. (1997a). A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272, 21403-21407.
- Lavan, B.E., Lane, W.S., and Lienhard, G.E. (1997b). The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272, 11439-11443.
- Lewis, G.F., Carpentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23, 201-229.
- Liang, C.P., Han, S., Senokuchi, T., and Tall, A.R. (2007). The macrophage at the crossroads of insulin resistance and atherosclerosis. *Circ Res* 100, 1546-1555.
- Liao, J.K., Shin, W.S., Lee, W.Y., and Clark, S.L. (1995). Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270, 319-324.
- Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V.Z., and Folco, E. (2010). Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 74, 213-220.
- Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317-325.
- Lin, H.V., Ren, H., Samuel, V.T., Lee, H.Y., Lu, T.Y., Shulman, G.I., and Accili, D. (2011). Diabetes in mice with selective impairment of insulin action in Glut4-expressing tissues. *Diabetes* 60, 700-709.
- Liu, S.C., Wang, Q., Lienhard, G.E., and Keller, S.R. (1999). Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J Biol Chem* 274, 18093-18099.
- Liu, Y., Sanoff, H.K., Cho, H., Burd, C.E., Torrice, C., Mohlke, K.L., Ibrahim, J.G., Thomas, N.E., and Sharpless, N.E. (2009). INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS One* 4, e5027.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175-184.
- Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.
- Mackman, N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1015-1022.

- Maenhaut, N., and Van de Voorde, J. (2011). Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med* 9, 25.
- Maestro, R., Dei Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H., and Hannon, G.J. (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 13, 2207-2217.
- Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 222-231.
- Malumbres, M., Perez De Castro, I., Hernandez, M.I., Jimenez, M., Corral, T., and Pellicer, A. (2000). Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Mol Cell Biol* 20, 2915-2925.
- Mallat, Z., and Tedgui, A. (2007). Cytokines as regulators of atherosclerosis in murine models. *Curr Drug Targets* 8, 1264-1272.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Mason, S.L., Loughran, O., and La Thangue, N.B. (2002). p14(ARF) regulates E2F activity. *Oncogene* 21, 4220-4230.
- Matheu, A., Maraver, A., Collado, M., Garcia-Cao, I., Canamero, M., Borrás, C., Flores, J.M., Klatt, P., Vina, J., and Serrano, M. (2009). Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell* 8, 152-161.
- Matheu, A., Maraver, A., Klatt, P., Flores, I., Garcia-Cao, I., Borrás, C., Flores, J.M., Vina, J., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448, 375-379.
- Matheu, A., Pantoja, C., Efeyan, A., Criado, L.M., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Klatt, P., and Serrano, M. (2004). Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 18, 2736-2746.
- Matsumura, I., Tanaka, H., and Kanakura, Y. (2003). E2F1 and c-Myc in cell growth and death. *Cell Cycle* 2, 333-338.
- McPherson, R., Pertsemlidis, A., Kavaslar, N., Stewart, A., Roberts, R., Cox, D.R., Hinds, D.A., Pennacchio, L.A., Tybjaerg-Hansen, A., Folsom, A.R., *et al.* (2007). A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 316, 1488-1491.
- Meir, K.S., and Leitersdorf, E. (2004). Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1006-1014.
- Melzer, D., Frayling, T.M., Murray, A., Hurst, A.J., Harries, L.W., Song, H., Khaw, K., Luben, R., Surtees, P.G., Bandinelli, S.S., *et al.* (2007). A common variant of the p16(INK4a) genetic region is associated with physical function in older people. *Mech Ageing Dev* 128, 370-377.
- Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196, 430-443.
- Molofsky, A.V., Slutsky, S.G., Joseph, N.M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N.E., and Morrison, S.J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443, 448-452.
- Moore, K.J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341-355.

- Moreno, P.R., and Fuster, V. (2004). New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *Journal of the American College of Cardiology* 44, 2293-2300.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., and Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-140.
- Nandi, A., Kitamura, Y., Kahn, C.R., and Accili, D. (2004). Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 84, 623-647.
- Navab, M., Fogelman, A.M., Berliner, J.A., Territo, M.C., Demer, L.L., Frank, J.S., Watson, A.D., Edwards, P.A., and Lusis, A.J. (1995). Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 76, 18C-23C.
- Navab, M., Imes, S.S., Hama, S.Y., Hough, G.P., Ross, L.A., Bork, R.W., Valente, A.J., Berliner, J.A., Drinkwater, D.C., Laks, H., *et al.* (1991). Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 88, 2039-2046.
- Neeli, H., Gadi, R., and Rader, D.J. (2009). Managing diabetic dyslipidemia: beyond statin therapy. *Curr Diab Rep* 9, 11-17.
- Newby, A.C. (2008). Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2108-2114.
- Nigro, J., Osman, N., Dart, A.M., and Little, P.J. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev* 27(3), 242-259.
- Nomura, S., Shouzu, A., Omoto, S., Nishikawa, M., and Fukuhara, S. (2000). Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes. *Clin Exp Immunol* 121, 437-443.
- Nunn, A.V., Bell, J.D., and Guy, G.W. (2009). Lifestyle-induced metabolic inflexibility and accelerated ageing syndrome: insulin resistance, friend or foe? *Nutr Metab (Lond)* 6, 16.
- Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79, 547-550.
- Nurse, P., Masui, Y., and Hartwell, L. (1998). Understanding the cell cycle. *Nat Med* 4, 1103-1106.
- O'Farrell, P.H. (2001). Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol* 11, 512-519.
- Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 409, 1067-1070.
- Ost, A., Danielsson, A., Liden, M., Eriksson, U., Nystrom, F.H., and Stralfors, P. (2007). Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. *Faseb J* 21, 3696-3704.
- Owens, G.K., Kumar, M.S., and Wamhoff, B.R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84, 767-801.

- Palmer, I., and Wingfield, P.T. (2004). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 6*, Unit 6 3.
- Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* *395*, 125-126.
- Pasmant, E., Sabbagh, A., Vidaud, M., and Bieche, I. (2010). ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *Faseb J*.
- Passegue, E., and Wagner, E.F. (2000). JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo J* *19*, 2969-2979.
- Paumelle, R., Tulasne, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B., and Fafeur, V. (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* *21*, 2309-2319.
- Peters, W., and Charo, I.F. (2001). Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* *12*, 175-180.
- Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hagaman, J.R., Oliver, P.M., and Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 4471-4475.
- Pirro, M., Mauriege, P., Tchernof, A., Cantin, B., Dagenais, G.R., Despres, J.P., and Lamarche, B. (2002). Plasma free fatty acid levels and the risk of ischemic heart disease in men: prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Atherosclerosis* *160*, 377-384.
- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* *71*, 343-353.
- Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Hannon, G.J., Rehberger, P.A., Trono, D., Richter, K.H., Walker, C., Beach, D., Sherr, C.J., and Serrano, M. (1995). Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene* *11*, 635-645.
- Rader, D.J., and Daugherty, A. (2008). Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* *451*, 904-913.
- Radfar, A., Unnikrishnan, I., Lee, H.W., DePinho, R.A., and Rosenberg, N. (1998). p19(Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 13194-13199.
- Remedi, M.S., and Nichols, C.G. (2009). Hyperinsulinism and diabetes: genetic dissection of beta cell metabolism-excitation coupling in mice. *Cell Metab* *10*, 442-453.
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Durr, P., and Wlaschek, M. (2006). p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* *5*, 379-389.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massague, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* *9*, 1831-1845.
- Rhodes, C.J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* *307*, 380-384.

- Rosen, P., Nawroth, P.P., King, G., Moller, W., Tritschler, H.J., and Packer, L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 17, 189-212.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.
- Ross, R., and Fuster, V. (1996). The pathogenesis of atherosclerosis. . In *Atherosclerosis and coronary artery disease*, V. Fuster, R. Ross, and E.J. Topol, eds. (Philadelphia, Lippincott-Raven), pp. 491-507.
- Rowland, B.D., Denisov, S.G., Douma, S., Stunnenberg, H.G., Bernards, R., and Peeper, D.S. (2002). E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest. *Cancer Cell* 2, 55-65.
- Ruchat, S.M., Elks, C.E., Loos, R.J., Vohl, M.C., Weisnagel, S.J., Rankinen, T., Bouchard, C., and Perusse, L. (2009). Association between insulin secretion, insulin sensitivity and type 2 diabetes susceptibility variants identified in genome-wide association studies. *Acta diabetologica* 46, 217-226.
- Samani, N.J., Erdmann, J., Hall, A.S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R.J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H.E., *et al.* (2007). Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 357, 443-453.
- Sanz-Gonzalez, S.M., Barquin, L., Garcia-Cao, I., Roque, M., Gonzalez, J.M., Fuster, J.J., Castells, M.T., Flores, J.M., Serrano, M., and Andres, V. (2007). Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury but has no effect on native atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 75, 803-812.
- Sartipy, P., and Loskutoff, D.J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7265-7270.
- Sata, M., and Walsh, K. (1998). Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 102, 1682-1689.
- Satyanarayana, A., and Rudolph, K.L. (2004). p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age. *J Clin Invest* 114, 1237-1240.
- Saxena, R., Voight, B.F., Lyssenko, V., Burt, N.P., de Bakker, P.I., Chen, H., Roix, J.J., Kathiresan, S., Hirschhorn, J.N., Daly, M.J., *et al.* (2007). Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316, 1331-1336.
- Scott, L.J., Mohlke, K.L., Bonnycastle, L.L., Willer, C.J., Li, Y., Duren, W.L., Erdos, M.R., Stringham, H.M., Chines, P.S., Jackson, A.U., *et al.* (2007). A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341-1345.
- Schmidt, A.M., and Stern, D. (2000). Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Curr Atheroscler Rep* 2, 430-436.
- Semenkovich, C.F. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest* 116, 1813-1822.
- Serrano, M. (1997). The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 237, 7-13.

- Serrano, M. (2000). The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis* *21*, 865-869.
- Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* *366*, 704-707.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593-602.
- Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Molecular cell biology* *8*, 703-712.
- Sherr, C.J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* *73*, 1059-1065.
- Sherr, C.J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* *60*, 3689-3695.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* *9*, 1149-1163.
- Shete, S., Hosking, F.J., Robertson, L.B., Dobbins, S.E., Sanson, M., Malmer, B., Simon, M., Marie, Y., Boisselier, B., Delattre, J.Y., *et al.* (2009). Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet* *41*, 899-904.
- Smith-Hall, J., Pons, S., Patti, M.E., Burks, D.J., Yenush, L., Sun, X.J., Kahn, C.R., and White, M.F. (1997). The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry* *36*, 8304-8310.
- Smithies, O., and Maeda, N. (1995). Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5266-5272.
- Stancakova, A., Kuulasmaa, T., Paananen, J., Jackson, A.U., Bonnycastle, L.L., Collins, F.S., Boehnke, M., Kuusisto, J., and Laakso, M. (2009). Association of 18 confirmed susceptibility loci for type 2 diabetes with indices of insulin release, proinsulin conversion, and insulin sensitivity in 5,327 nondiabetic Finnish men. *Diabetes* *58*, 2129-2136.
- Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* *92*, 1355-1374.
- Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., and Baron, A.D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* *97*, 2601-2610.
- Stolar, M.W., and Chilton, R.J. (2003). Type 2 diabetes, cardiovascular risk, and the link to insulin resistance. *Clinical therapeutics* *25 Suppl B*, B4-31.
- Sun, X.J., Pons, S., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Burks, D., Myers, M.G., Jr., Glasheen, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., *et al.* (1997). The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. *Mol Endocrinol* *11*, 251-262.

- Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., and White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-77.
- Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G., Jr., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., and White, M.F. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173-177.
- Tabas, I. (2009). Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress. *Antioxid Redox Signal* 11, 2333-2339.
- Taguchi, S., Oinuma, T., and Yamada, T. (2000). A comparative study of cultured smooth muscle cell proliferation and injury, utilizing glycated low density lipoproteins with slight oxidation, auto-oxidation, or extensive oxidation. *J Atheroscler Thromb* 7, 132-137.
- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., *et al.* (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182-186.
- Tanaka, K., Oda, N., Iwasaka, C., Abe, M., and Sato, Y. (1998). Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury. *J Cell Physiol* 176, 235-244.
- Thorens, B., and Mueckler, M. (2009). Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E141-145.
- Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J.T., Gertz, S.D., Fernandez-Ortiz, A., Chesebro, J.H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V., *et al.* (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95, 594-599.
- Verdeguer, F., Castro, C., Kubicek, M., Pla, D., Vila-Caballer, M., Vinue, A., Civeira, F., Pocovi, M., Calvete, J.J., and Andres, V. (2007). Complement regulation in murine and human hypercholesterolemia and role in the control of macrophage and smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* 76, 340-350.
- Vijayaraghavan, K. (2010). Treatment of dyslipidemia in patients with type 2 diabetes. *Lipids Health Dis* 9, 144.
- Virkamaki, A., Ueki, K., and Kahn, C.R. (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103, 931-943.
- Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A., and Schwartz, S.M. (2000). Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1262-1275.
- Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Finn, A.V., Gold, H.K., Tulenko, T.N., Wrenn, S.P., and Narula, J. (2005). Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2054-2061.
- Visel, A., Zhu, Y., May, D., Afzal, V., Gong, E., Attanasio, C., Blow, M.J., Cohen, J.C., Rubin, E.M., and Pennacchio, L.A. (2010). Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* 464, 409-412.
- Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 275-283.

- W. van Lammeren, G., F., L.M., Borst, G., J., de Kleijn, D.P., P. M. de Vries, J., and Pasterkamp, G. (2011). Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque. *Curr Cardiol Rev* 7, 22-27.
- Wang, X., Collins, H.L., Ranalletta, M., Fuki, I.V., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., Tall, A.R., and Rader, D.J. (2007). Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 117, 2216-2224.
- Wasylyk, C., Bradford, A.P., Gutierrez-Hartmann, A., and Wasylyk, B. (1997). Conserved mechanisms of Ras regulation of evolutionary related transcription factors, Ets1 and Pointed P2. *Oncogene* 14, 899-913.
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1, 20-26.
- Weintraub, S.J., Prater, C.A., and Dean, D.C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358, 259-261.
- White, M.F., and Kahn, C.R. (1994). The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269, 1-4.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053.
- Withers, D.J., Burks, D.J., Towery, H.H., Altamuro, S.L., Flint, C.L., and White, M.F. (1999). Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 23, 32-40.
- Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., *et al.* (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900-904.
- Zambon, S., Zannoni, S., Romanato, G., Corti, M.C., Noale, M., Sartori, L., Musacchio, E., Baggio, G., Crepaldi, G., and Manzato, E. (2009). Metabolic syndrome and all-cause and cardiovascular mortality in an Italian elderly population: the Progetto Veneto Anziani (Pro.V.A.) Study. *Diabetes Care* 32, 153-159.
- Zeggini, E., Weedon, M.N., Lindgren, C.M., Frayling, T.M., Elliott, K.S., Lango, H., Timpson, N.J., Perry, J.R., Rayner, N.W., Freathy, R.M., *et al.* (2007). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316, 1336-1341.
- Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258, 468-471.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-2433.
- Zindy, F., Quelle, D.E., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15, 203-211.

