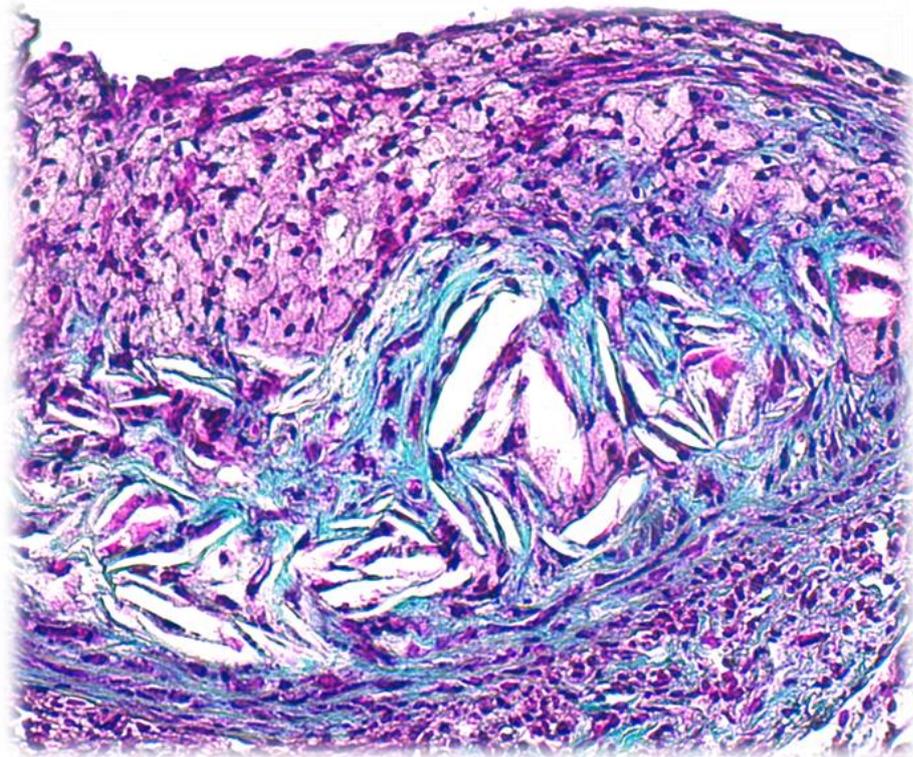




VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

PAPEL DE LA LIPASA HEPÁTICA Y DE LOS GENES CDKN2A/2B EN LA ATEROSCLEROSIS Y LA DIABETES



**TESIS DOCTORAL
IRENE ANDRÉS BLASCO
2016**



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA



Programa de Doctorado:

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**Título: Papel de la lipasa hepática y de los genes
CDKN2A/2B en la aterosclerosis y la diabetes**

Tesis Doctoral presentada por:

Irene Andrés Blasco

Directora:

Dra. Herminia González Navarro

Tutor:

Dr. José Enrique O'Connor Blasco



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



Dña. Herminia González Navarro, Investigadora de la Fundación del Hospital Clínico Universitario de Valencia, INCLIVA,

CERTIFICA

Que el trabajo titulado **Papel de la lipasa hepática y de los genes CDKN2A/2B en la aterosclerosis y la diabetes** presentado por Dña. Irene Andrés Blasco, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha sido realizado en el INCLIVA bajo su dirección para obtener el grado de Doctor.

Valencia, 02 de Noviembre de 2015

Director:
Herminia González Navarro

Tutor:
José Enrique O'Connor Blasco

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

Título: Estudio del papel del locus *Ink4/Arf* en la funcionalidad de las células β en un modelo murino de diabetes

Entidad financiadora: PROYECTO PAULA una iniciativa para el estudio de la diabetes.

Investigador responsable: Herminia González Navarro.

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 Navarro.

Título: Estudio de los mecanismos moleculares de la Diabetes Mellitus y su papel en el desarrollo de la aterosclerosis

Entidad financiadora: ISCIII PI13/00834.

Investigador responsable: Herminia González Navarro.

*A mis padres y a Jose,
Gracias*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han estado a mi lado para que esta tesis saliera adelante.

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora Herminia todo lo que ha hecho por mí, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por dirigirme en el día a día, por su paciencia, por sus buenos consejos, por confiar en mí. Sin ella esto no habría sido posible.

A Ángela, por todo lo que me ha enseñado desde el primer día que entré por el laboratorio, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por sus conocimientos que han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

A Andrea, que empezó siendo una compañera pero se volvió una amiga. Con ella comencé esta aventura y con ella la terminé. Desde el principio me ha escuchado y apoyado en los momentos más difíciles.

También agradecer a todos los profesionales del INCLIVA que de una manera u otra han contribuido en la realización de este trabajo.

En especial agradecer al Proyecto Paula la labor que realiza recaudando fondos para poder investigar en la diabetes. Gracias a todos los colaboradores que con su granito de arena han hecho posible que esta tesis saliera adelante. A Cristina Ponce, gracias por todo.

Por último quiero dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres por todo lo que han hecho y continúan haciendo por mí. A mi hermana Mamen, porque siempre está ahí para hacerme desconectar. A mi sobrino Victor, que sin él saberlo, me da ánimos para continuar. Y finalmente a Jose, por estos cinco años a mi lado en lo bueno y en lo no tan bueno, por ayudarme en todo, por sufrirme. Con él a mi lado es todo más fácil.

Gracias

Irene Andrés

<u>ÍNDICE</u>	1
<u>ABREVIATURAS</u>	9
<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	13
<u>ÍNDICE DE TABLAS</u>	17
<u>INTRODUCCIÓN</u>	21
1. La aterosclerosis	21
1.1. Incidencia de las enfermedades cardiovasculares	21
1.2. Estructura de la pared arterial	21
1.3. Alteraciones de la homeostasis de la pared vascular: la aterosclerosis	22
1.4. Inicio, progresión y vulnerabilidad de la placa	23
1.5. La inflamación en la aterosclerosis	28
1.5.1. Las citoquinas en la aterosclerosis	28
1.5.2. Las células inflamatorias en la aterosclerosis	30
1.5.3. El eje inflamatorio LIGHT(TNFSF14)/Receptor Linfotoxina- β	33
1.5.4. El eje inflamatorio LIGHT(TNFSF14)/LT β -R en la aterosclerosis	34
1.6. Modelos murinos de aterosclerosis. El ratón deficiente en apolipoproteína E como modelo de hipercolesterolemia y aterosclerosis	35
2. Factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular (ECV): la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y el síndrome metabólico (SMet)	36
2.1. Características de la DMT2 y el SMet	36
2.2. La señalización de la insulina	38
2.3. Vía de señalización de la PI3K y Vía de señalización de las MAPK	41
2.4. Efectos de la DMT2 y del SMet en la ECV	43
2.5. Modelos murinos de aterosclerosis acelerada por DMT2/SMet	44
3. Papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en las enfermedades asociadas a la edad	45
3.1. Estructura génica del locus <i>Ink4/Arf</i>	45

3.2. Papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en el ciclo celular, senescencia y apoptosis	47
3.3. Papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en las enfermedades asociadas a la edad	50
3.4. El ratón transgénico <i>SuperInk4/Arf</i>	51
4. Papel de la lipasa hepática en las enfermedades metabólicas	52
4.1. Papel de la lipasa hepática en el metabolismo de las lipoproteínas y en la ECV	52
4.2. Papel de la lipasa hepática en el DMT2	55
5. La esteatosis hepática	56
5.1. La relación entre esteatosis hepática, resistencia a insulina y síndrome metabólico	58
5.2. La esteatosis hepática y la inflamación	60
<u>OBJETIVOS</u>	63
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	67
1. Estudios <i>in vivo</i> en ratones	67
1.1. Ratones, genotipado y dietas	67
1.2. Medidas metabólicas en ratones	68
1.2.1. Determinación de lípidos circulantes en plasma y distribución de la grasa corporal	68
1.2.2. Estudios de tolerancia a la glucosa y determinación de glucosa e insulina	69
1.2.3. Determinación de la sensibilidad a la insulina y del índice HOMA-RI para la evaluación de la resistencia a la insulina	70
1.3. Obtención y procesamiento de tejidos de ratón	71
1.4. Cuantificación de la aterosclerosis	72
1.4.1. Cuantificación del tamaño de la placa aterosclerótica <i>en face</i> en el cayado aórtico y en la aorta torácica	72
1.4.2. Cuantificación de la aterosclerosis en la aorta	73

1.5. Caracterización de la composición de la placa de ateroma	73
1.5.1. Cuantificación del contenido en macrófagos en la placa de ateroma	74
1.5.2. Cuantificación del contenido de células T en la placa de ateroma	75
1.5.3. Cuantificación de los macrófagos que expresan el receptor de la linfotóxina β (LT β -R) en la placa de ateroma	75
1.5.4. Cuantificación de macrófagos proliferantes en la placa de ateroma	76
1.5.5. Cuantificación del contenido de colágeno en la placa de ateroma	76
1.6. Caracterización inmunohistológica del páncreas de ratón	77
1.6.1. Determinación de la masa de células β en los islotes pancreáticos	77
1.6.2. Cuantificación de la proliferación en los islotes pancreáticos	78
1.6.3. Cuantificación de la relación α/β en los islotes pancreáticos	79
1.6.4. Cuantificación del contenido de células T y de focos inflamatorios	79
1.7. Caracterización del hígado en el ratón	80
1.7.1. Determinación de la esteatosis hepática	80
1.7.2. Determinación del contenido de macrófagos	81
1.8. Aislamiento de islotes pancreáticos, obtención de lisados proteicos y ensayo de secreción de insulina	82
1.9. Experimentos de señalización de insulina y estimulación con TNF α <i>in vivo</i>	83
1.10. Tratamiento <i>in vivo</i> con LIGHT	83
2. Estudios <i>in vitro</i> en cultivos celulares	84
2.1. Obtención de cultivos primarios de ratón	84
2.2. Determinación de células espumosas	84
2.3. Ensayos funcionales <i>in Vitro</i>	85
2.3.1. Estudios de proliferación y migración en macrófagos	85
2.3.2. Análisis de la apoptosis	86
2.3.3. Aislamiento de linfocitos y monocitos humanos	86

2.3.4. Experimentos de silenciamiento en macrófagos humanos derivados de monocitos	87
3. Caracterización de la inflamación sistémica en los modelos de ratón	87
3.1. Estudio de las citoquinas circulantes	87
3.2. Caracterización de las células circulantes mediante citometría de flujo en ratón	87
4. Estudios en pacientes	89
4.1. Características clínicas de los pacientes	89
4.2. Evaluación de la arteria carótida humana por ultrasonido	90
4.3. Análisis bioquímicos, obtención de plasma y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)	91
4.4. Caracterización de células circulantes mediante citometría de flujo	91
4.5. Estudio de las citoquinas circulantes en plasma humano	92
5. Estudios de expresión de proteínas mediante Western Blot	92
5.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos	92
5.2. Experimentos de co-inmunoprecipitación	93
5.3. Análisis de la expresión proteica mediante SDS-PAGE y Western Blot	93
6. Estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	96
6.1. Obtención y cuantificación de los extractos de ARN	96
6.2. Retrotranscripción del ARN y análisis de la expresión génica mediante qPCR	97
7. Análisis estadísticos	98
<u>RESULTADOS</u>	103
<u>1. Estudio del papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en el desarrollo de resistencia a insulina y en la inflamación asociada en ratones <i>Irs2</i>^{+/-} y en pacientes con DMT2 y con enfermedad coronaria</u>	103
1.1. Estudio del papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en el metabolismo de	103

carbohidratos, en la funcionalidad del páncreas y en la homeostasis del hígado en ratones <i>Irs2</i>+/-	
1.1.1. Estudio de la expresión del locus <i>Ink4/Arf</i> en ratones <i>Irs2</i> +/- <i>SuperInk4/Arf</i>	93
1.1.2. El locus <i>Ink4/Arf</i> disminuye la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina inducida por la deficiencia parcial de <i>Irs2</i>	104
1.1.3. Efecto de una dosis extra del locus <i>Ink4/Arf</i> en el páncreas de ratones <i>Irs2</i> +/-	107
1.1.4. La sobreexpresión del locus en el ratón <i>Irs2</i> +/- disminuye la esteatosis hepática y la inflamación asociada	109
1.2. Estudio del efecto de la sobreexpresión del locus <i>Ink4/Arf</i> en la inflamación en ratones <i>Irs2</i>+/-	111
1.2.1. La reducción de la inflamación sistémica en el ratón <i>Irs2</i> +/- <i>SuperInk4/Arf</i>	111
1.2.2. Caracterización de macrófagos procedentes de los ratones <i>WT</i> , <i>Irs2</i> +/- y <i>Irs2</i> +/- <i>Ink4/Arf</i>	114
1.2.3. La administración de TNF α <i>in vivo</i> en el ratón <i>Irs2</i> +/- <i>Ink4/Arf</i> disminuye la señalización canónica de la insulina mediada por IRS/AKT y aumenta la vía de estrés SAPK/JNK	116
1.3. Estudios del papel del locus <i>Ink4/Arf</i> en el desarrollo de resistencia a la insulina y en la inflamación asociada en pacientes con DMT2 y con CAD	120
1.3.1. Caracterización cardiometabólica de los controles y pacientes con DMT2 y DMT2-CAD	120
1.3.2. La expresión de los genes <i>Cdkn2a</i> , <i>Cdkn2b</i> y <i>Cdkn2bas</i> disminuye en los sujetos humanos con DMT2 y DMT2-CAD	121
1.3.3. Análisis del fenotipo de los leucocitos en los sujetos con DMT2 y DMT2-CAD	124
1.3.4. El tratamiento con insulina produce un cambio en el fenotipo de los linfocitos T	129
<u>2. Estudio del papel de la lipasa hepática en la homeostasis de la glucosa, en la esteatosis hepática y en la aterosclerosis diabética</u>	133
2.1. Estudio del papel de la lipasa hepática en la homeostasis de la	133

glucosa y en la esteatosis hepática

2.1.1. Caracterización metabólica de los ratones <i>HL</i> ^{-/-} y <i>WT</i> sometidos a dieta rica en grasa y colesterol	133
2.1.2. Los ratones <i>HL</i> ^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasa y en colesterol presentan un aumento en el contenido de triglicéridos en el hígado	136
2.1.3. Los ratones <i>HL</i> ^{-/-} sometidos a dieta grasa muestran un aumento en la inflamación sistémica	138
2.1.4. Caracterización del páncreas en ratones <i>HL</i> ^{-/-} y <i>WT</i>	140
2.1.5. Activación de las vías de estrés en los ratones <i>HL</i> ^{-/-} y <i>WT</i>	141
2.1.6. La deficiencia de HL no es suficiente para inducir esteatosis hepática en el ratón alimentado con dieta control	144
2.2. Estudio del papel de la lipasa hepática en la aterosclerosis acelerada por resistencia a insulina y en la inflamación	147
2.2.1. Caracterización metabólica de los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} con inactivación génica de la HL alimentados con dieta aterogénica durante 2 meses	147
2.2.2. La disrupción génica de la HL en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} alimentados con dieta aterogénica reduce la aterosclerosis y produce cambios en la composición de la placa	151
2.2.3. La disminución del tamaño de la lesión en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} está asociada con una disminución de la inflamación	156
2.2.4. Los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} poseen una disminución de la vía LIGHT(TNSFS14)/Receptor de la linfotoxina-β	157
2.2.5. La disminución del tamaño de la lesión en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} está causada por una reducción en la tasa proliferativa en macrófagos	159
2.2.6. El tratamiento con LIGHT aumenta el desarrollo de la lesión y de los monocitos proinflamatorios Ly6C ^{hi} en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-}	161
2.2.7. El tratamiento con LIGHT no afecta a los niveles de lípidos circulantes en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-}	164
2.2.8. Efecto de LIGHT sobre los macrófagos tras la inactivación de la HL	165

2.3. Estudios de expresión en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con SMet y SMet-RI	167
2.3.1. Caracterización demográfica de pacientes con SMet y SMet-RI	168
2.3.2. La progresión de la aterosclerosis se asociada con un incremento en la expresión de la vía LIGHT/LT β -R y de la HL en pacientes con SMet-RI	169
<u>DISCUSIÓN</u>	175
<u>CONCLUSIONES</u>	191
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	195
<u>ANEXO</u>	223

ABREVIATURAS

ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCG1	<i>ATP-binding cassette transporter G1</i>
AGAC	Alta en g rasa y alta en c olesterol
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>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARF-BP1/Mule	<i>ARF binding protein 1/Mcl1-ubiquitin ligase E3</i>
AUC	Área debajo de la curva (<i>area under the curve</i>)
BrdU	B romo- d esoxiuridina
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (<i>cyclin dependent kinase</i>)
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
CDKN2BAS	<i>CDKN2B antisense</i>
CETP	Proteína transferasa de ésteres de colesterol (<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>)
c-HDL	Colesterol HDL
Cip-Kip	<i>CDK interacting protein / kinase inhibitory protein</i>
CKI	Inhibidor de CDK (<i>cyclin kinase inhibitor</i>)
CMLVs	Células de m úsculo liso v ascular
CMSPs	Células m ononucleares de s angre p eriférica
c-TOTAL	Colesterol t otal
DAB	<i>Diaminobencidina</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMT2	Diabetes m ellitus tipo 2
ECV	Enfermedad c ardiovascular
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>)
GLUT	Proteína transportadora de glucosa (<i>glucose transporter</i>)
GRB2	Proteína del receptor del factor de crecimiento 2 (<i>growth factor</i>)

Abreviaturas

	<i>receptor-bound protein 2)</i>
GWA	Estudios de asociación genética (<i>genome-wide association</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidad (<i>high density lipoprotein</i>)
HL	Lipasa Hepática (<i>hepatic lipase</i>)
HOMA	Evaluación del modelo homeostático (<i>homeostasis model assesment</i>)
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i>
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1 (<i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia (<i>intermediate density lipoprotein</i>)
IFNγ	Interferón γ
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
INK4	Inhibidor de CDK4 (<i>inhibitors of CDK4</i>)
IRS	Sustrato del receptor de la insulina (<i>insulin receptor substrate</i>)
LCM	<i>L929-cell conditioned medium</i>
LD	Gotas lipídicas (<i>Lipid Droplets</i>)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>low density lipoprotein</i>)
LDLmo	LDL modificada
LDLox	LDL oxidada
LIGHT	<i>(Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes)</i>
LIPC	Gen de la lipasa hepática (Lipase , hepatic)
LT	Linfotoxina
LTβ-R	Receptor de la linfotoxina β (Lymphotoxin β Receptor)
MAPK	Quinasa activada por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCP1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1 (<i>monocyte chemotactic protein 1</i>)
MCSF	Factor de estimulación de colonias de macrófagos (<i>macrophage colony stimulation factor</i>)
MDM2	<i>Murine doble minute 2</i>
MDMO	Macrófagos derivados de médula ósea
MEK	Quinasa regulada por mitógenos (<i>mitogen extracellular signal-regulated kinase</i>)
MTS	Supresor múltiple de tumores (<i>multiple tumor supressor</i>)

NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólico (<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NEFA	Ácidos grasos no esterificados (<i>Non-esterified fatty acids</i>)
NF-κB	Factor nuclear- kappa β (<i>Nuclear factor-kappaB</i>)
OMS	Organización mundial de la salud
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDK1	<i>Phosphatidylinositol Dependent Kinase 1</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>)
RI	Resistencia a la insulina
INS-R	Receptor de la insulina (<i>insulin receptor</i>)
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>
siRNA	ARN pequeño de interferencia (<i>small interfering RNA</i>)
SMet	Síndrome metabólico
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)
TA	Temperatura ambiente
TG	Triglicéridos
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β (<i>Transforming growth factor β</i>)
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral α (<i>tumor necrosis factor</i>)
TNFSF14	Superfamilia 14 del factor de necrosis tumoral (<i>tumor necrosis factor superfamily 14</i>)

Abreviaturas

TPBS	<i>Tween-20 Phosphate buffered saline</i>
Treg	T reguladoras
TTG	Test de tolerancia a la g lucosa
TTI	Test de tolerancia a la insulina
UV	U ltravioleta
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1 (<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad (<i>very low density lipoprotein</i>)
WB	W estern B lot
WT	Silvestre (<i>wild type</i>)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la pared arterial	22
Figura 2	Procesos aterogénicos que inician la formación de la estría grasa	24
Figura 3	Progresión de la lesión y formación de la capa fibrosa	25
Figura 4	Características de la placa estable y la placa vulnerable o inestable	26
Figura 5	Rotura de la placa y trombosis	28
Figura 6	Citoquinas involucradas en la aterogénesis	32
Figura 7	La RI y su relación con la ECV y la DMT2	37
Figura 8	Estructura del INS-R	39
Figura 9	Activación de las vías de señalización de la insulina	40
Figura 10	Estructura del locus <i>Ink4/Arf</i>	46
Figura 11	Fases del ciclo celular	48
Figura 12	Modulación del ciclo celular mediada por los productos génicos del locus <i>Ink4/Arf</i>	49
Figura 13	Principales SNPs asociados a ECV, DMT2 y otras complicaciones	50
Figura 14	Esquema de la función clásica de la lipasa hepática como un enzima lipolítico y como ligando	53
Figura 15	Esquema de los múltiples papeles de la lipasa hepática en el metabolismo de las lipoproteínas y en la captación de lípidos en el hígado y en el resto de tejidos periféricos presentes en la pared del vaso	54
Figura 16	Perfil fenotípico de las partículas de LDL en sujetos sanos y pacientes con enfermedad cardiovascular	56
Figura 17	Fases del modelo de formación de las gotas lipídicas	58
Figura 18	Anatomía de la arteria aorta	72
Figura 19	Expresión del locus <i>Ink4/Arf</i> en hígado e islotes pancreáticos de ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-SuperInk4/Arf</i>	104
Figura 20	El aumento en la expresión del locus <i>Ink4/Arf</i> en los ratones <i>Irs2+/-</i> no afecta a la distribución de la grasa corporal	105
Figura 21	El aumento en la expresión del locus <i>Ink4/Arf</i> en los ratones <i>Irs2+/-</i> mejora el metabolismo de la glucosa	106
Figura 22	El aumento en la expresión del locus <i>Ink4/Arf</i> en los ratones <i>Irs2+/-</i> mejora la sensibilidad a la insulina	107
Figura 23	Caracterización de los islotes pancreáticos en los ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-SuperInk4/Arf</i>	108
Figura 24	Caracterización del hígado en los ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-SuperInk4/Arf</i>	109

Índice de figuras

Figura 25	Caracterización del hígado en los ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/- Superlnk4/Arf</i>	110
Figura 26	Caracterización del hígado en los ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/- Superlnk4/Arf</i>	110
Figura 27	Inflamación sistémica en los ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/- Superlnk4/Arf</i>	112
Figura 28	Caracterización de los linfocitos T circulantes en ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Superlnk4/Arf</i>	113
Figura 29	Caracterización de los macrófagos procedentes de los ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Superlnk4/Arf</i>	114
Figura 30	Caracterización funcional de los macrófagos procedentes de los ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/-Superlnk4/Arf</i>	115
Figura 31	Señalización de la insulina en los ratones <i>WT</i> , <i>Irs2+/-</i> e <i>Irs2+/- Superlnk4/Arf</i>	117
Figura 32	Efecto de TNF α sobre la señalización de la insulina en el ratón <i>Irs2+/-Superlnk4/Arf</i>	119
Figura 33	Análisis de expresión de los genes <i>Cdkn2a</i> (<i>variante 1</i> , <i>p16^{INK4a}</i> y <i>variante 4</i> , <i>p14^{ARF}</i>) <i>Cdkn2b</i> y <i>Cdkn2bas</i> en CMSPs de sujetos control, DMT2 y DMT2-CAD	122
Figura 34	Estudios de correlación en sujetos control, DMT2 y DMT2-CAD	123
Figura 35	Análisis del ciclo celular de CMSPs	123
Figura 36	Caracterización de los leucocitos circulantes en sujetos control, DMT2 y DMT2-CAD	124
Figura 37	Caracterización de los leucocitos circulantes en los individuos control, DMT2 y DMT2-CAD	125
Figura 38	Caracterización de monocitos circulantes en los tres grupos de sujetos	126
Figura 39	Caracterización de monocitos circulantes en los tres grupos de sujetos	127
Figura 40	Estudios de correlación en sujetos control, DMT2 y DMT2-CAD	128
Figura 41	Efecto de los altos niveles de insulina sobre el fenotipo de los leucocitos	129
Figura 42	Parámetros plasmáticos en los ratones <i>WT</i> y <i>HL-/-</i> alimentados durante 4 meses con dieta AGAC	133
Figura 43	La deficiencia de HL produce intolerancia a la glucosa en ratones alimentados durante 4 meses con dieta AGAC	135
Figura 44	Caracterización del hígado en los ratones <i>WT</i> y <i>HL-/-</i>	137
Figura 45	Análisis de la inflamación en los ratones <i>WT</i> y <i>HL-/-</i>	139
Figura 46	Caracterización de los islotes pancreáticos en los ratones <i>WT</i> y <i>HL-/-</i>	141
Figura 47	Expresión de las estrés MAPK en el hígado de los ratones <i>WT</i> y	143

	<i>HL</i> ^{-/-}	
Figura 48	Análisis metabólico en ratones <i>WT</i> y <i>HL</i> ^{-/-} de 6 meses de edad alimentados con dieta control	145
Figura 49	Caracterización del hígado y del páncreas en ratones <i>WT</i> y <i>HL</i> ^{-/-} de 6 meses de edad alimentados con dieta control	146
Figura 50	Caracterización metabólica de los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} alimentados con dieta AGAC durante 2 meses	148
Figura 51	Caracterización metabólica de los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} alimentados con dieta AGAC durante 2 meses	149
Figura 52	Estudio de la tolerancia a la glucosa en ratones con SMet-RI, <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} , y en ratones sin RI, <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/+} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/+} <i>HL</i> ^{-/-}	150
Figura 53	Caracterización metabólica de hembras <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} alimentadas con dieta AGAC durante 2 meses	151
Figura 54	Análisis de la lesión aterosclerótica de los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} tras 2 meses de dieta AGAC	152
Figura 55	Análisis de la lesión aterosclerótica en las hembras <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} tras 2 meses de dieta AGAC	153
Figura 56	Desarrollo de la lesión ateromatosa en los ratones RI <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} y en los ratones no RI <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/+} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/+} <i>HL</i> ^{-/-}	154
Figura 57	Análisis de la composición de la placa de ateroma en secciones de la aorta en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} tras 2 meses de dieta AGAC	155
Figura 58	Análisis de la inflamación sistémica en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} tras 2 meses de tratamiento con dieta AGAC	157
Figura 59	Expresión del eje inflamatorio LIGHT(TNFSF14)/LTβ-R en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} tras 2 meses de tratamiento con dieta AGAC	158
Figura 60	Expresión de mediadores inflamatorios en el cayado aórtico de los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} tras 2 meses de dieta	159
Figura 61	Tasa de proliferación en secciones de aorta de ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} tras 2 meses a dieta	160
Figura 62	Análisis <i>in vitro</i> de la proliferación y de la migración de MDMO en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{+/+} y <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} .	161
Figura 63	La exposición de los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} con LIGHT murino recombinante aumenta la aterosclerosis	162
Figura 64	Caracterización de la lesión en secciones de aorta en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-} con dieta AGAC en controles y tratados con	163

Índice de figuras

	LIGHT durante 28 días	
Figura 65	Efecto del tratamiento con LIGHT en los leucocitos circulantes en ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-}	164
Figura 66	Efecto del tratamiento con LIGHT sobre los niveles de lípidos en los ratones <i>apoE</i> ^{-/-} <i>Irs2</i> ^{+/-} <i>HL</i> ^{-/-}	165
Figura 67	Efecto de LIGHT sobre MDMO procedentes de ratones <i>apoE</i> ^{-/-}	166
Figura 68	Efecto de LIGHT sobre macrófagos humanos tratados con siRNA-control y siRNA-LIPC	167
Figura 69	Análisis de la aterosclerosis y de los leucocitos en sujetos con SMet y SMet-RI	170
Figura 70	Análisis de la expresión de la HL en leucocitos de sujetos con SMet y SMet-RI	171

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Citoquinas proaterogénicas y antiaterogénicas	30
Tabla 2	Criterios diagnósticos de SMet propuestos por el “ <i>Program Adult Treatment Panel III (ATP III)</i> ”	36
Tabla 3	Alteraciones proaterogénicas y proaterotrombóticas en la DMT2/SMet	43
Tabla 4	Cebadores y condiciones de las reacciones de PCR para el genotipado de cada gen	68
Tabla 5	Reactivos empleados en las tinciones histológicas de colágeno y hematoxilina/eosina	77
Tabla 6	Anticuerpos primarios empleados en técnicas de inmunohistoquímica	81
Tabla 7	Anticuerpos secundarios y reactivos químicos empleados en técnicas de inmunohistoquímica	82
Tabla 8	Anticuerpos y reactivos utilizados para citometría de flujo en ratón.	89
Tabla 9	Anticuerpos utilizados para citometría de flujo en humanos.	92
Tabla 10	Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante Western Blot	95
Tabla 11	Anticuerpos secundarios y reactivos empleados para la detección de proteínas mediante Western blot	96
Tabla 12	Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica mediante PCR	97
Tabla 13	Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica por qPCR en CMSPs de pacientes	98
Tabla 14	Características clínicas y demográficas de los sujetos control y pacientes con DMT2 y con DMT2-CAD	121
Tabla 15	Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio	168

INTRODUCCIÓN

1. ATEROSCLEROSIS

1.1. Incidencia de las enfermedades cardiovasculares

La enfermedad cardiovascular (ECV) constituye la principal causa de mortalidad en el mundo (W van Lammeren G, 2011). Hasta un 38% del total de defunciones en el mundo se atribuyen a la ECV (*Fuente: Organización Mundial de la Salud-ENT Perfiles de países, 2011*). En el año 2030, según cálculos de la OMS, cerca de 23.6 millones de personas fallecerán a causa de la ECV. Por otro lado, cinco de las diez principales amenazas mundiales para la salud se relacionan con los factores de riesgo de la ECV como son la hipertensión arterial, el tabaquismo, el consumo de alcohol excesivo, la hipercolesterolemia, la diabetes y la obesidad. En España, según las estadísticas del año 2006, las ECV produjeron 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 representando el 57.9% de la mortalidad cardiovascular total, de las cuales el 30,7% son debidas a enfermedad coronaria y el 27.2% a ictus (Bertomeu et al., 2008). En la mayoría de los casos, tanto en el infarto de miocardio como en el ictus, la ECV es producida por una complicación severa y aguda del proceso de aterosclerosis, que es una anomalía de 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, formada por una monocapa de células endoteliales y tejido conectivo, regula la permeabilidad de la pared vascular a elementos celulares y macromoléculas. La monocapa endotelial o el endotelio próximo a la luz del vaso es la superficie a través de la cual se produce el intercambio de nutrientes y de oxígeno entre la sangre y los tejidos circundantes, y esta monocapa 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 secretan la gran parte de los componentes de la matriz extracelular, como elastina, colágeno y proteoglicanos. La capa de CMLVs determina la elasticidad y la contractilidad de la pared arterial. La capa más externa y

lejana a la luz del vaso es la adventicia y está compuesta por una red de tejido conectivo e incluye fibras de colágeno, fibras elásticas, fibroblastos, CMLVs en baja proporción y terminaciones nerviosas.

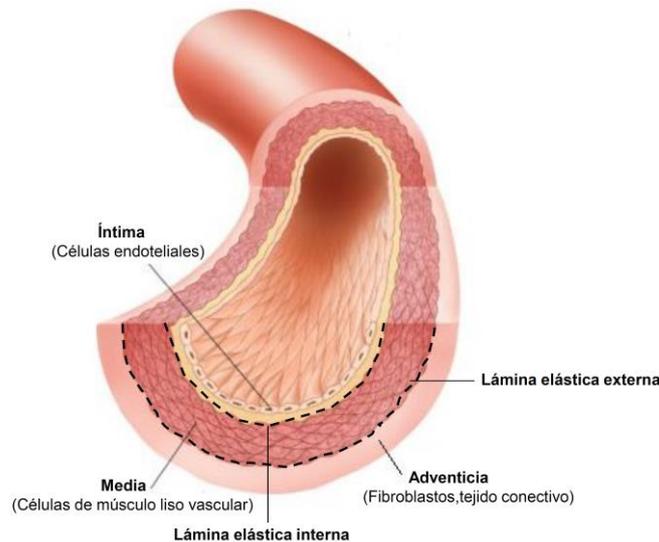


Figura 1. Estructura de la pared arterial. La capa más externa a la luz del vaso es la capa adventicia y está formada por una red de fibras de colágeno, fibras elásticas, fibroblastos y CMLVs. La capa en contacto con la luz del vaso se denomina túnica íntima y la constituye una monocapa de células endoteliales que, junto con tejido conectivo, constituye una barrera selectiva permeable entre la sangre y los tejidos de la pared del vaso. 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.

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

Una de las alteraciones fisiopatológicas de la pared vascular más frecuente es la aterosclerosis, un proceso patológico que se desarrolla en las arterias de gran calibre y en las arterias coronarias. El proceso avanza durante el envejecimiento humano y se acelera en presencia de determinados factores de riesgo cardiovascular. La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial que provoca la acumulación progresiva de material lipídico y de células en el subendotelio vascular. Este proceso causa un estrechamiento de la luz del vaso, la pérdida de la elasticidad de la pared arterial y deterioro de la función vascular. En etapas tempranas de la enfermedad, la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL, *del inglés, Low Density Lipoproteins*) en el espacio subendotelial será clave en el inicio de la formación de la lesión ateromatosa. Los primeros eventos en la aterogénesis incluyen la interacción de monocitos y linfocitos circulantes con las células endoteliales activadas, seguido del rodamiento, la firme adhesión al endotelio de estos leucocitos y la migración al espacio subendotelial. En el subendotelio, debido a la presencia de mediadores inflamatorios,

los monocitos se diferencian a macrófagos. La enfermedad aterosclerótica es, por lo tanto, un proceso inflamatorio en el que las células del sistema inmune, principalmente macrófagos y linfocitos T, y en menor medida linfocitos B, modulan la respuesta inflamatoria. El proceso inflamatorio crónico se perpetúa como resultado de un proceso inflamatorio crónico no resuelto, el cual da lugar a la formación de lesiones ateromatosas más complejas (Libby, 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, 2011; Navab et al., 1995; Ross and Fuster, 1996).

1.4. Inicio, progresión y vulnerabilidad de la placa

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

Las lesiones ateroscleróticas comienzan en forma de estrías grasas en el subendotelio vascular y el proceso lo inicia la disfunción endotelial. La presencia de factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia o tabaquismo) causan la disfunción y activación de las células endoteliales aumentando la permeabilidad del endotelio vascular y facilitando la penetración y retención de las LDL (Libby, 2011) (**Figura 2**). 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 leucocitos al espacio subendotelial. Por la 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), y la acetilación (LDLac), generan productos que inducen la actividad quimiotáctica de monocitos y aumentan la expresión de citoquinas proinflamatorias, como MCP1 (*del inglés, Monocyte Chemotactic Protein-1*) (Navab and Berliner, 1991). Estas alteraciones perpetúan el proceso de reclutamiento de monocitos. Además, las LDLox provocan apoptosis de las células endoteliales (Sata, 1998) y alteran la producción de

óxido nítrico (NO) y de radicales libres (Liao, 1995) con el consiguiente deterioro de la función normal del endotelio. Además, los macrófagos activados captan las LDLox mediante los receptores basura o *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).

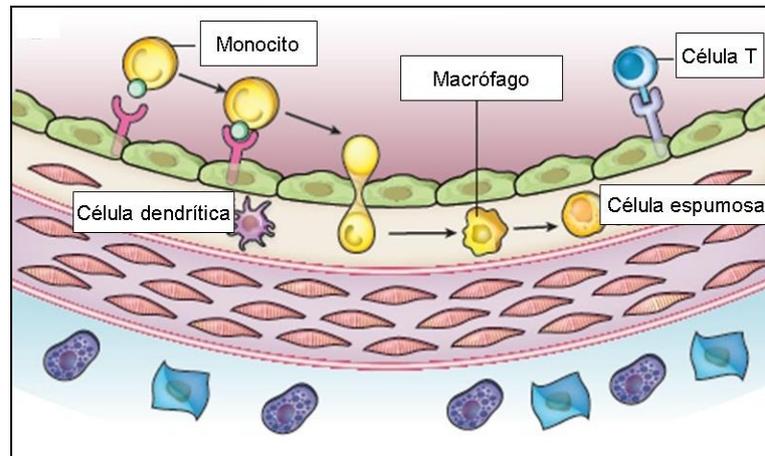


Figura 2. Procesos aterogénicos que inician la formación de la estría grasa. Los estados iniciales de la aterosclerosis incluye la adhesión de leucocitos al endotelio activado, migración dirigida de los leucocitos ligados a la íntima, maduración de monocitos (los más numerosos de los leucocitos reclutados) a macrófagos, y la captación de lípidos, produciendo células espumosas (*Adaptado de Libby, 2011*).

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 reduciendo el número de células espumosas. Así, las HDL participan en el transporte reverso de colesterol desde las células espumosas, un proceso mediado por las proteínas de membrana transportadoras 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 and Tall, 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, 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. Los linfocitos, principalmente linfocitos T, también reclutados al subendotelio vascular, desempeñan un papel determinante en la cronificación del proceso iniciado. La activación de linfocitos T favorece en los 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, a su vez, a las CMLVs las cuales cambian de un fenotipo contráctil no proliferativo, típico de arterias sanas, a un fenotipo más proliferativo y migratorio (Lusis, 2000). Esta activación provoca que las CMLVs proliferen, migren y atraviesen la túnica media y la lámina elástica interna y se acumulen en la íntima. Las CMLVs de la íntima contribuyen a la síntesis de matriz extracelular debido a la secreción de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. En etapas más avanzadas las CMLVs activadas también captan lipoproteínas modificadas contribuyendo, junto con las células espumosas derivadas de macrófagos, al engrosamiento del núcleo lipídico (Owens, 2004; Ross, 1993). La acumulación de las CMLVs en la parte más cercana al lumen vascular junto con la matriz extracelular constituyen la capa fibrosa (Libby, 2011) (**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.

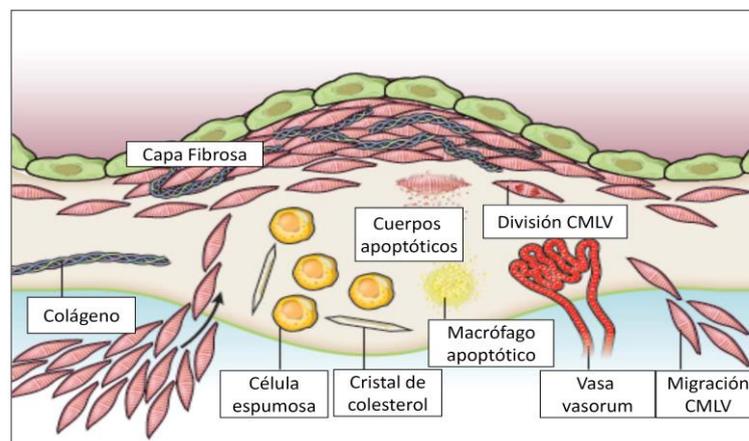


Figura 3. Progresión de la lesión y formación de la capa fibrosa. La progresiva acumulación de células espumosas aumenta el tamaño de la lesión contribuyendo al engrosamiento del núcleo lipídico. Los agentes quimiotácticos liberados por estas células promueven la migración de las CMLVs desde la media 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 (*Adaptado de Libby, 2011*).

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 y se produce el adelgazamiento de la media y de la adventicia hasta que el remodelado 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 capa 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 capa fibrosa pobre en colágeno y en CMLVs (Stary and Rosenfeld, 1995) (**Figura 4**).

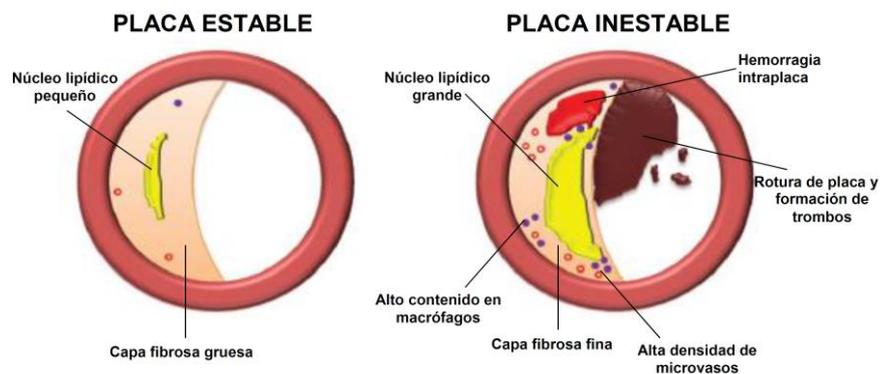


Figura 4. Características de la placa estable y la placa vulnerable o inestable. La placa estable es resistente a la rotura por poseer una gruesa capa fibrosa, con matriz extracelular y CMLVS, y pocos elementos inflamatorios. Por el contrario, la placa inestable o vulnerable posee una capa fibrosa delgada y elementos inflamatorios que promueven la erosión y rotura de la placa (*Adaptado de W. van Lammeren, 2011*).

Uno de los 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 los 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). Además, la apoptosis excesiva de macrófagos provoca una disminución en la secreción del factor de crecimiento transformante β (TGF β *del inglés, transforming growth factor β*), lo cual reduce la síntesis de colágeno por las CMLVs (Fadok and P.M., 1998), el contenido en colágeno de la placa y, por lo tanto, su estabilidad.

Otro mecanismo que contribuye a la vulnerabilidad y la rotura 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, 2003), lo que conlleva a una menor capacidad para sintetizar los componentes de la matriz celular y una disminución del grosor de la capa 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 capa fibrosa (Libby, 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.

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, 2003; Virmani, 2000).

La mayoría de episodios que producen rotura de placa no causan síntomas clínicos agudos debido 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 del 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, 2010; Toschi V, 1997) **(Figura 5)**.

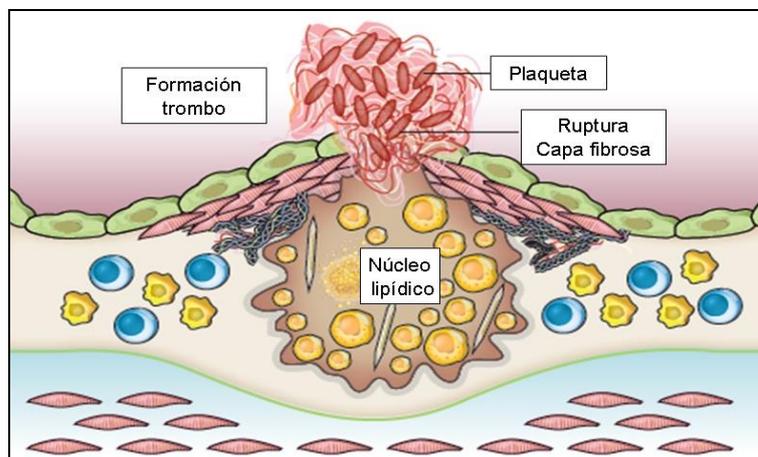


Figura 5. Rotura de la placa y trombosis. La apoptosis de macrófagos y de CMLVs conduce a la formación del núcleo necrótico lipídico y a la acumulación de colesterol extracelular. La ruptura de la placa expone los componentes de la sangre al factor tisular iniciando los procesos de coagulación, con reclutamiento de plaquetas y formación de un trombo (*Adaptado de Libby, 2011*).

1.5. La inflamación en la aterosclerosis

1.5.1. Las citoquinas en la aterosclerosis

Stanley Cohen introdujo por primera vez la palabra citoquina en 1974. Hasta entonces el término linfoquina, propuesto por Dumonde en 1969, había sido utilizado para designar factores derivados de linfocitos y proteínas secretadas de una variedad de células, afectando al crecimiento o función de diferentes tipos celulares. En 1979, el nombre de interleuquina se propuso para caracterizar proteínas con “la capacidad de actuar como señales de comunicación entre diferentes poblaciones de leucocitos” (Mizel and Farrar, 1979). En 1989 Balkwill y Burke definieron citoquina como “un término para un grupo de reguladores celulares que se producen por una amplia variedad de células en el cuerpo, juegan un importante papel en diferentes respuestas fisiológicas, están involucradas en la patofisiología de una serie de enfermedades y tienen un potencial terapéutico” (Balkwill and Burke, 1989). Las células involucradas en el proceso aterosclerótico incluyen células vasculares (endotelio y músculo liso), monocitos/macrófagos, linfocitos (T, B, NK), células dendríticas y mastocitos. Ellas secretan o son estimuladas por factores solubles como péptidos, glicoproteínas, proteasas y un conjunto de citoquinas (Nathan, 2002; Tedgui and Mallat, 2006).

Hoy en día, las citoquinas consisten en más de 50 factores involucrados en la comunicación intercelular, la cual regula procesos biológicos como el crecimiento corporal, lactancia, adiposidad y hematopoyesis. Las citoquinas se agrupan en varias clases: interleuquinas (IL), factores de necrosis tumoral (TNF), interferones (IFN), factores estimulantes de colonias, factores de crecimiento transformante y quimiocinas. Son especialmente importantes para la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunes y tienen funciones cruciales en el control de la inmunidad adaptativa e innata. Las células T helper (Th), que han sido clasificadas según las citoquinas que secretan, dando como resultado o bien una respuesta inmune mediada por células Th1, asociadas con la secreción de IL2 e IFN, o bien una respuesta inmune humoral mediada por células Th2 y asociada con la secreción de IL4, IL5, IL10 e IL13. Las citoquinas se clasifican de acuerdo con la homología estructural de sus receptores en clase I y clase II, y presentan las siguientes características (Koenen and Weber, 2011; Tedgui and Mallat, 2006):

1-Muestran actividades pleiotrópicas: pueden provocar diferentes respuestas celulares dependiendo del tipo celular y contexto.

2-Actúan sinérgicamente: la asociación de dos citoquinas amplifica su actividad. Inducen la expresión de otros receptores de citoquinas.

3-Actúan de una manera autocrina o paracrina: pueden estimular a la propia célula que la produce o pueden intervenir a través de interacción directa célula-célula.

4-Normalmente comparten subunidades de receptores de las citoquinas.

Las citoquinas también se clasifican de acuerdo a su actividad pro o antiaterogénica **(Tabla 1)**.

Tabla 1. Citoquinas proaterogénicas y antiaterogénicas

Citoquinas proaterogénicas	Citoquinas antiaterogénicas
Familia TNFR TNF- α Linfotixina CD40L	
Familia IL1 IL1 IL18	IL1ra IL18BP
Citoquinas clase I IL2 IL4 IL6 IL12	IL6 IL9
Citoquinas clase II IFN- γ	IL10
Factores hematopoyéticos M-CSF	
Quimiocinas/receptores quimiocinas IL8/CXCR2 MCP1/CCR2 Fractalkina/CX3CR1 MIF	
Familia TGF β	TGF β

1.5.2. Las células inflamatorias en la aterosclerosis

En la sangre se pueden distinguir diferentes poblaciones de leucocitos con diferentes fenotipos y que predisponen a la aterosclerosis y a la ECV. Los monocitos circulantes comprenden un 10% y un 4% del total de los leucocitos en humanos y ratones respectivamente. Los monocitos se componen de diferentes subpoblaciones dependiendo de los marcadores que presentan en la superficie celular y, por tanto, tienen características funcionales distintas por lo que esta variedad puede ser relevante en el proceso de la aterosclerosis. Las subpoblaciones difieren en su fenotipo, tamaño, morfología y granulación (Jaipersad et al., 2014). Los monocitos humanos se diferencian por los marcadores CD14 (parte del receptor del lipopolisacárido) y CD16 (también conocido como Fc γ III) que se expresan en la superficie celular, clasificándose como monocitos clásicos CD14 $^{++}$, intermedios CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$ (ambos inflamatorios) y alternativos CD14 $^{+}$ CD16 $^{++}$ (antiinflamatorios) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Los monocitos circulantes en el ratón se clasifican en dos principales subpoblaciones, Ly6C hi y Ly6C low . Los monocitos Ly6C hi son proinflamatorios y reclutados en los eventos inflamatorios en los tejidos, como la

formación de la placa de ateroma. Su reclutamiento es altamente dependiente de MCP1 por lo que expresan elevados niveles del receptor de MCP1. Dadas sus características, se proponen como precursores de los macrófagos proinflamatorios M1. Normalmente representan un 50% de los monocitos en ratones, pero este porcentaje incrementa con la hiperlipidemia.

A diferencia de los Ly6C^{hi}, los monocitos Ly6C^{low} poseen funciones de vigilancia, se presupone que son precursores de los macrófagos antiinflamatorios M2 asociados a la función de reparación de tejido. Expresan niveles elevados del receptor CX3CR1 y bajos niveles de Ly6C. También se ha propuesto que los monocitos Ly6C^{low} son equivalentes a la subpoblación de monocitos antiinflamatoria CD14⁺CD16⁺⁺ en humanos (Moore et al., 2013) mientras que los monocitos Ly6C^{hi} se proponen como los equivalentes a las subpoblaciones de monocitos CD14⁺⁺ y CD14⁺⁺CD16⁺.

Todas las células presentes en las placas ateroscleróticas son capaces de producir citoquinas (**Figura 6**). Los macrófagos son, sin duda, la fuente principal de citoquinas en la placa de ateroma. Actualmente la clasificación más extendida es la de macrófagos con activación clásica (macrófagos M1) o con activación alternativa (macrófagos M2). Esta nomenclatura fue propuesta para establecer un paralelismo entre los macrófagos M1 y la respuesta Th1, y los macrófagos M2 y la respuesta Th2 (Mantovani et al., 2004). Los estímulos que producen la diferenciación de un macrófago hacia M1 son IFN γ , TNF α e inductores de éste tales como ligandos del TLR (*del inglés, Toll-Like Receptor*) y el lipopolisacárido (LPS). Una vez activados los macrófagos M1 son capaces de iniciar mecanismos efectores como la muerte de parásitos intracelulares, lisis de células tumorales, producción y secreción de citoquinas como IL1 β , IL6, IL18, TNF α , CCL3, CXL9 y CXCL10, generación de óxido nítrico, aumento en la expresión del CMH tipo II, CD86 y de la presentación antigénica asociada a células T, por ello que se consideran células con propiedades aterogénicas. Los estímulos que producen la diferenciación de un macrófago hacia M2 son IL4, IL13, IL1, IL10 y la vitamina D3 entre otros. Dentro de los M2 encontramos los subtipos M2a, de activación mediada por IL4 e IL13, M2b, y los macrófagos M2c cuya activación está mediada por IL10 y los glucocorticoides. Se consideran por tanto células con menor actividad aterogénica (Moore et al., 2013). En la placa aterosclerótica, el IFN γ puede ser producido por células Th1 CD4⁺, células CD8⁺ y células T NK. Hay que destacar que las quimiocinas pueden tener una estrecha relación evolutiva con los receptores basura o *scavenger* en que las quimiocinas

generalmente tienen una actividad similar a la de éstos, uniendo LDLox a través de su dominio de unión al receptor. (Koenen and Weber, 2011; Tedgui and Mallat, 2006).

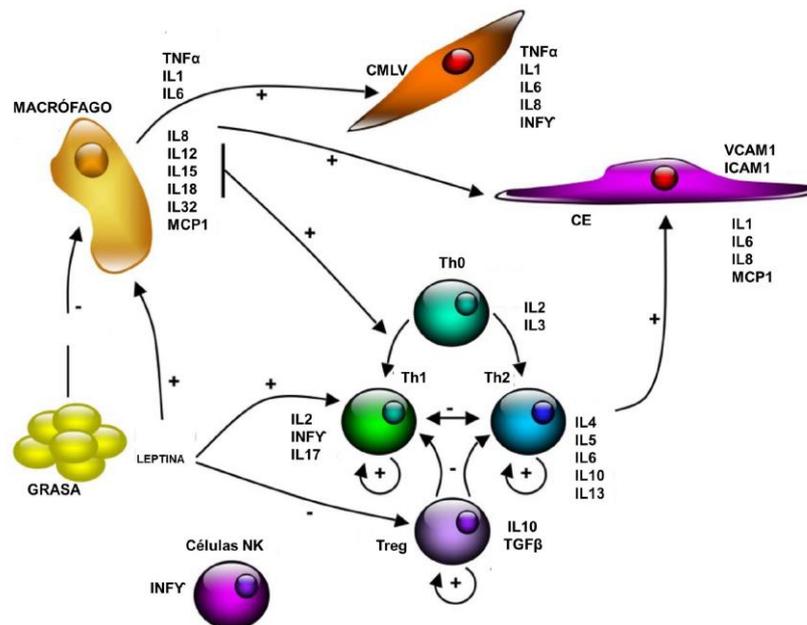


Figura 6. Citoquinas involucradas en la aterogénesis. Las citoquinas son producidas por diferentes tipos celulares, incluyendo células vasculares, células inflamatorias y adipocitos. IL12 e IL18 son producidas por los macrófagos y son potentes inductores de IFN γ y promueven la diferenciación de células T nacientes en células Th1 proaterogénicas. Los macrófagos o citoquinas derivadas de macrófagos también activan las células musculares lisas (CMLV) y células endoteliales (CE) para producir una serie de mediadores proinflamatorios. Por otra parte, las citoquinas antiinflamatorias IL10 y TGF β , también producidas por macrófagos, promueven la diferenciación de las células Treg antiaterogénicas. Otros mediadores antiinflamatorios con propiedades antiaterogénicas potentes incluyen la IL1. Curiosamente, IL4, el prototipo de las células Th2, tiene propiedades proinflamatorias en las CE. Los adipocitos producen ambos mediadores pro y antiinflamatorios. La leptina activa las células Th1 pero inhibe la función de las células Treg. La adiponectina ha mostrado que amortigua la activación de macrófagos (Adaptado de Tedgui, 2006).

Los linfocitos T residen principalmente en la capa adventicia de las arterias sanas no inflamadas. Sin embargo se ha observado que en condiciones de aterosclerosis aumenta el reclutamiento de células T en la aorta, tanto en humanos como en diferentes modelos animales (Tse et al., 2013). Entre las células T que expresan el marcador CD4, las células Th1 son proaterogénicas, las células Treg son ateroprotectivas, y el papel de las células Th2 y Th17 no está bien definido (Tse et al., 2013). Las células Treg se caracterizan por poseer una actividad supresora de las células efectoras inmunes. Se ha demostrado que juegan un papel en la prevención de la aterosclerosis y tienen diferentes fenotipos funcionales. Son una población que se define como células T que expresan CD4, CD25 y el factor de transcripción Foxp3 (Foks et al., 2015). Las células Treg maduran en el timo y tienen receptores de

linfocitos con una alta afinidad por autoantígenos (pero que han escapado de la selección negativa) y son por lo tanto capaces de regular negativamente efectos inmunes proinflamatorios a través de las citoquinas IL10 y TGF β . Estas células T son únicas en que no requieren de la exposición de antígeno en la periferia para obtener sus actividades inmunopresoras (Koenen and Weber, 2011).

1.5.3. El eje inflamatorio LIGHT(TNFSF14)/Receptor Linfotóxina- β

Las linfotóxicas (LT) son miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 14 (TNFSF14, *del inglés tumor necrosis factor superfamily*), un grupo de ligandos y su correspondiente familia de receptores (Owens et al., 2010). Varios de los más de 40 miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral son moléculas proinflamatorias o citoquinas solubles y otras son proteínas de membrana que pueden unir receptores sobre células adyacentes. Dos miembros de esta familia, la linfotóxina y LIGHT (*del inglés, lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes*), comparten características con el factor de necrosis tumoral, como promover la inflamación, la muerte celular y la defensa contra patógenos (Hansson, 2007).

LIGHT es una proteína transmembrana coestimuladora tipo II de 29 kDa que se expresa en la superficie de las células T activadas. Está implicada en el mantenimiento de la homeostasis en células dendríticas, plaquetas, monocitos y granulocitos. Además, está involucrada en la regulación de la supervivencia y proliferación celular y en la respuesta inmune innata y adaptativa (Chellan et al., 2013; Mauri et al., 1998; Otterdal et al., 2015). LIGHT tiene tres receptores, HVEM (*del inglés, Herpesvirus entry mediator*) expresado predominantemente sobre células T, LT β -R (*del inglés, linfotóxina- β receptor*) encontrado sobre células estromales y el receptor de reclamo 3, que sólo se ha detectado en humanos (Chellan et al., 2013). El LT-R se expresa en células estromales de los tejidos linfoides, en los hepatocitos y macrófagos. Juega un papel importante en la comunicación entre células T y en la presentación de antígenos a través de la activación de estas células. Además, está implicado en la expresión de citoquinas inflamatorias y en la inducción de apoptosis (Wei et al., 2006). La unión de LT y LIGHT con el LT-R conduce a la expresión de quimiocinas implicadas en enfermedades inflamatorias (Hansson, 2007; Owens et al., 2010).

1.5.4. El eje inflamatorio LIGHT(TNFSF14)/LT β -R en la aterosclerosis

Estudios recientes relacionan al eje inflamatorio LIGHT(TNFSF14)/LT β -R con los procesos inflamatorios de la aterogénesis. Se ha observado que en ratones envejecidos *apoE*^{-/-} la activación de las CMLVs y la expresión de diferentes citoquinas inflamatorias en las placas de ateroma en aorta abdominal está mediada por el LT β -R (Grabner et al., 2009). También se ha mostrado un incremento de los niveles plasmáticos de LIGHT en pacientes con angina inestable (Scholz et al., 2005) y altos niveles de LT β -R circulantes en la aterosclerosis en humanos (Owens et al., 2010).

Por otro lado, existen investigaciones que han señalado a LT y a LIGHT como moléculas clave en la aterosclerosis de manera indirecta al modular el metabolismo lipídico. Así, la desregulación de la expresión de LIGHT en las células T resulta en hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (Lo et al., 2007) debido a una inhibición de la HL. Curiosamente, en el ratón deficiente para el receptor de LDL, que carece de la capacidad de controlar los niveles lipídicos en sangre, la inhibición de la señalización de LIGHT con el receptor soluble de la linfotoxina β atenúa la dislipidemia. De esta manera el sistema inmune influye directamente en el metabolismo de los lípidos y, por lo tanto, en el desarrollo de aterosclerosis (Lo et al., 2007).

Sin embargo estudios en ratones que carecen del LT β -R han dado lugar a resultados discrepantes en el desarrollo de la aterosclerosis (Grandoch et al., 2015; Hu et al., 2015). En uno de los estudios, la inactivación genética de *Lt β r* en ratones *apoE*^{-/-} disminuyó la aterosclerosis por el aumento de la subpoblación de monocitos Ly6C^{low} (Grandoch et al., 2015), mientras que en el estudio de Hu, los ratones *apoE*^{-/-} *Lt β r*^{-/-} mostraron una aterosclerosis acelerada y demostraron que la vía CMLV-LT β -R es ateroprotectiva por el mantenimiento de la homeostasis de las células T y el tamaño de los órganos linfoides terciarios aórticos (Hu et al., 2015). Estos estudios indican un papel complejo de este eje inflamatorio en el proceso aterosclerótico.

1.6. Modelos murinos de aterosclerosis. 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 (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 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 ratones 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 c-VLDL y niveles disminuidos de c-HDL comparado con ratones WT. Los niveles de triglicéridos (TG) no están afectados en ratones *apoE*^{-/-}.

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).

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

2.1. Características de la DMT2 y del SMet

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.

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 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 SMet 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) (**Tabla 2**). 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 SMet/DMT2 y el desarrollo de ECV (Biddinger and Kahn, 2006).

Tabla 2. Criterios diagnósticos del SMet 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 \geq 130 mmHg Presión arterial diastólica \geq 85 mmHg
Glucosa en ayunas	>100-110 mg/dL

La DMT2 y el SMet son dos de los factores de riesgo más importantes con un alto impacto sociosanitario ya que aumentan de 2 a 10 veces el riesgo de desarrollar aterosclerosis y ECV. 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, entre otros, al envejecimiento de la población y a la adquisición de estilos de vida sedentarios que conllevan a 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 se estima que la prevalencia de la DMT2 aumentará en un 40% en el año 2025, en comparación con el año 2000 (Conget, 2002).

Por otro lado, la prevalencia del SMet 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, 2002) y se manifiesta como una asociación de síntomas que comprenden la intolerancia a la glucosa, dislipidemia, obesidad e hipertensión que a su vez favorecen la aparición de la DMT2 y de la ECV (**Figura 7**).

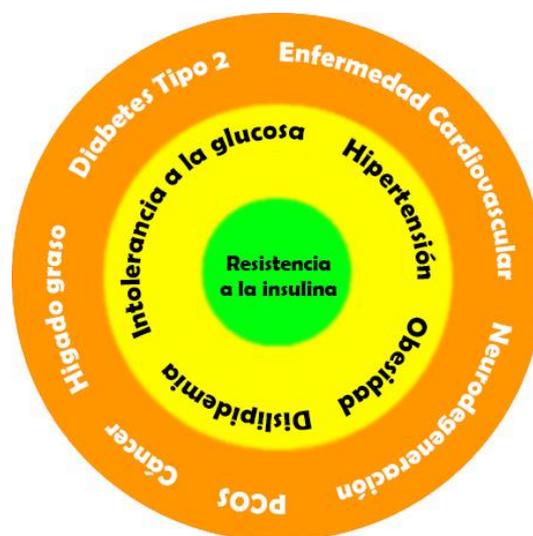


Figura 7. La RI y su relación con la ECV y la DMT2. La RI juega un papel pivote en el desarrollo de algunas alteraciones metabólicas características del SMet (en amarillo). Estas alteraciones metabólicas promueven el desarrollo de distintas patologías (en naranja). (PCOS, síndrome de ovario poliquístico) (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 son el músculo o tejido adiposo, entre otros, produciendo una alteración del metabolismo de la glucosa (Biddinger and Kahn, 2006). La falta de sensibilidad a la insulina en el hígado aumenta la producción endógena de glucosa, gluconeogénesis, favoreciendo el desequilibrio glucémico. Inicialmente, las células β pancreáticas compensan la pérdida de sensibilidad e incrementan la secreción de insulina, mediante la hiperplasia de la célula β , para mantener los niveles normales de glucosa lo que conlleva 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. Cuando este deterioro se agrava se produce una disminución en la producción de insulina y finalmente provoca la elevación en la concentración de glucosa en plasma. Niveles elevados de glucemia promueve la glucotoxicidad y daño en las células β , lo que conduce a su muerte por apoptosis y al establecimiento de la hiperglucemia característica de la DMT2 (Grundy et al., 2005; Semenkovich, 2006). En condiciones normales la apoptosis es mínima y es compensada mediante procesos de neogénesis o regeneración 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 produciendo la disminución de la masa celular y acelerando la aparición de DMT2 (Rhodes, 2005).

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 favoreciendo el flujo de ácidos grasos libres hacia la sangre. Los niveles elevados de ácidos grasos acaban produciendo lipotoxicidad también en músculo y en hígado, afectando al transporte y captación de la glucosa, mientras que en células β de páncreas acaban impidiendo la secreción de insulina (Beckman et al., 2002; Lewis, 2002).

2.2. 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 (INS-R, *del inglés insulin receptor*) situado en la membrana plasmática. El INS-R 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. 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 L, 2004; Virkamäki A, 1999) (**Figura 8**).

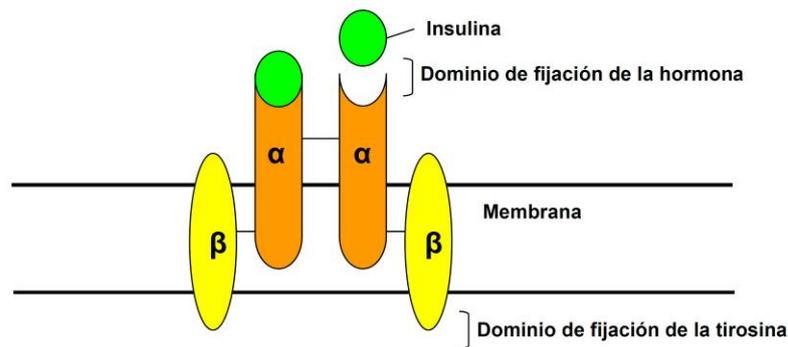


Figura 8. Estructura del INS-R. El INS-R se compone de dos unidades α , responsables del reconocimiento de la insulina, y de dos unidades β transmembrana. Tras la unión de la insulina, el INS-R se activa mediante fosforilación y transduce la señal mediante fosforilación a los efectores intracelulares IRS, los cuales son reciclados continuamente y desencadenan las cascadas de señalización.

Los componentes de la familia de las IRS son proteínas con un peso molecular que varía entre 60 y 185 KDa. 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 9**). De este modo la insulina regula el metabolismo energético, la expresión de sus genes diana y ejerce efectos mitogénicos (Avruch, 1998).

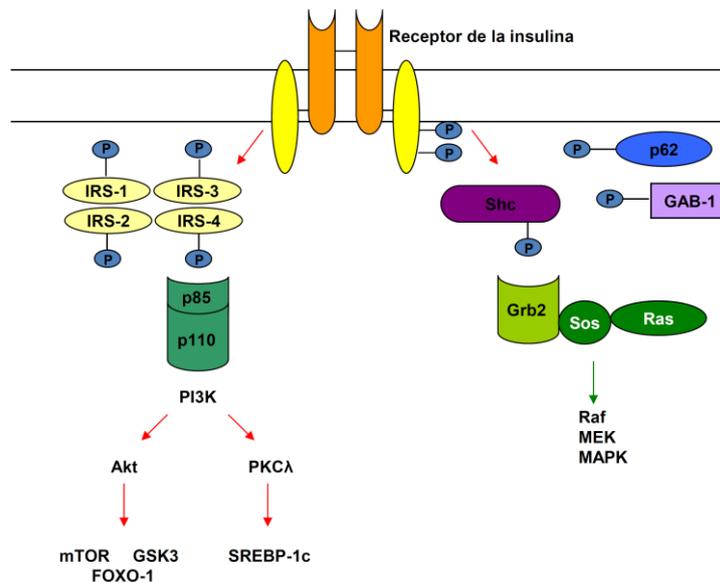


Figura 9. Activación de las vías de señalización de la insulina. Tras la unión de la insulina con su receptor y la fosforilación de las proteínas IRS éstas se unen a dominios SH de proteínas efectoras que activarán las vías de señalización de PI3K y MAPK (*Adaptado de Biddinger, 2006*).

Existen distintas formas de IRS con funciones específicas. En el ratón se han caracterizado cuatro componentes: IRS1, IRS2, IRS3 e IRS4. En humanos sólo se han identificado las proteínas IRS1, IRS2 e IRS4 (Bjornholm et al., 2002). IRS1, que es 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 en músculo esquelético y en tejido adiposo (Nandi et al., 2004). IRS2 se expresa en casi todas las células y tejidos y posee unos papeles importantes en la acción de la insulina en el hígado y en el mantenimiento de las células β pancreáticas.

Si bien tanto IRS1 como IRS2 se expresan en células β pancreáticas, IRS2 es el que desempeña un importante papel en la regulación de las células β (Rhodes, 2005). El aumento en la expresión de IRS2 promueve la replicación de las células β del páncreas, 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 causado por un aumento en la apoptosis (Kubota et al., 2000; Rhodes, 2005; Withers et al., 1998).

Numerosos estudios han demostrado las funciones específicas de los componentes IRS o del INS-R en la señalización de la insulina demostrando también que alteraciones de ellos producen características de RI y DMT2 (Biddinger and Kahn,

2006). Así, los ratones deficientes para IRS2 desarrollan DMT2 y presentan RI, tanto en tejidos periféricos como en hígado, pero también una 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, la inactivación de IRS1 en ratones sólo produce una moderada RI en tejidos periféricos y defectos en la tolerancia a la glucosa, pero no provoca diabetes (Chang L, 2004). 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 . IRS1 es un mediador del crecimiento somático, mientras que ambas proteínas están implicadas en la RI periférica.

Por otro lado, los ratones deficientes para el INS-R nacen con un ligero retraso en el crecimiento y se observa 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 y muerte por cetoacidosis diabética. Este fenotipo indica que el INS-R es necesario para la supervivencia pero no para el control metabólico y el crecimiento prenatal (Nandi et al., 2004).

2.3. Vía de señalización de la PI3K y vía de señalización de las MAPK

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 metabólicos de la insulina como son 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 INS-R, 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 L, 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 activada fosforila y activa serina-treonina quinasas adicionales siendo las más relevantes las tres isoformas de la proteína Akt (*del inglés, V-akt murine thymoma viral oncogene homolog kinase*) (Nandi et al., 2004). Se ha demostrado que 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). 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. Los transportadores GLUT presentan distintas isoformas que se expresan en distintos tejidos. En músculo esquelético y en adipocitos la insulina induce la translocación de GLUT4, 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).

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 activando secuencialmente a las quinasas Raf, MEK y ERK1/2 y, finalmente, desencadenando la cascada de señalización que conduce al crecimiento, diferenciación y proliferación celular.

2.4. Efectos de la DMT2 y del SMet en la ECV

Numerosos estudios clínicos ponen de manifiesto una clara relación entre DMT2/SMet y el riesgo de desarrollar complicaciones vasculares (Askari et al., 2002; Beckman et al., 2002; Gerstein and Yusuf, 1996; Stolar and Chilton, 2003) y otros estudios 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 3**) (Askari et al., 2002; Beckman et al., 2002; Kanter et al., 2007; Moreno and Fuster, 2004; Semenkovich, 2006; Stolar and Chilton, 2003). Así, los mediadores inflamatorios característicos del proceso inflamatorio crónico se han descrito que aumentan la vulnerabilidad de la placa al disminuir la supervivencia de las CMLV de la capa fibrosa (Martinez-Hervas et al., 2014).

Tabla 3. Alteraciones proaterogénicas y proaterotrombóticas en la DMT2/SMet

ALTERACIÓN	MECANISMO	EFFECTOS
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 de la DMT2/SMet induce apoptosis y disminución en la proliferación de CMLVs y de células endoteliales (Averill and Bornfeldt, 2009). 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). 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). Además, la hiperglucemia característica de la DMT2/SMet favorece la trombogénesis mediante la activación plaquetaria reduciendo la producción de inhibidores plaquetarios. Así, los pacientes con DMT2/SMet 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).

2.5. Modelos murinos de aterosclerosis acelerada por DMT2/SMet

Nuestras investigaciones y otras procedentes de otros laboratorios apuntan a que un fallo en la señalización de la insulina, en modelos murinos de aterosclerosis, contribuye a un aumento de la aterosclerosis en estados de SMet/RI (Baumgartl et al., 2006; Gonzalez-Navarro et al., 2007; Gonzalez-Navarro et al., 2008; Tabas et al., 2010) Específicamente, la inactivación de *Irs2* combinada con la ausencia del gen *apoE* (ratón *apoE^{-/-}Irs2^{-/-}*) produce intolerancia a la glucosa, RI, hipercolesterolemia y acelera el desarrollo de la aterosclerosis (Baumgartl et al., 2006; Gonzalez-Navarro et al., 2007). Resultados similares fueron obtenidos en ratones deficientes en el LDL-R con fallo en la señalización de la insulina en la línea mieloide causado por la inactivación en el INS-R (Tabas et al., 2010). Estos estudios son consistentes con la asociación clínica entre RI, DMT2 y aterosclerosis. Además, en ratones doble deficientes *apoE^{-/-}Irs2^{-/-}* se observó una correlación positiva entre los niveles circulantes de insulina y el tamaño de la lesión, sugiriendo que los niveles de insulina pueden predecir el tamaño de la placa de ateroma (Gonzalez-Navarro et al., 2007).

Consistente con estos resultados, pacientes con SMet/RI con mayor riesgo cardiovascular, mostraron un fallo en la señalización mediada por IRS2/AKT-ERK (Gonzalez-Navarro et al., 2008). En otro estudio también se mostró que ratones con una reducción moderada en la expresión de *Irs2*, *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}*, también desarrollan características de SMet, RI y aterosclerosis acelerada. Dicha inactivación parcial de *Irs2*, fue suficiente para inducir una mayor captación de LDLs acetiladas por parte de los macrófagos, indicando una mayor capacidad de formar células espumosas, y un aumento en la expresión de la citoquina proaterogénica *Mcp1*, demostrando un fenotipo proinflamatorio.

En otro estudio reciente de nuestro laboratorio, también hemos demostrado que los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* además de desarrollar más aterosclerosis presentan placas más vulnerables. Concretamente se mostró que uno de los mecanismos implicados en la generación de placas vulnerables inducido por la RI es la inducción de la muerte de las CMLV debido a una menor proliferación y a una mayor apoptosis de éstas produciendo capas fibrosas más delgadas. Además, se demostró una activación de la vía inflamatoria CX₃CR1/CX₃CL1 (Martinez-Hervas et al., 2014), un eje inflamatorio previamente asociado a placa vulnerable y enfermedad coronaria (Combadiere et al., 2003) lo que contribuye al cambio de fenotipo de las CMLVs provocados por la RI.

Estos últimos estudios sugieren que los mediadores inflamatorios juegan un papel fundamental en la aterosclerosis y vulnerabilidad de la placa asociada al SMet/RI.

3. PAPEL DEL LOCUS *INK4/ARF* EN LAS ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA EDAD

3.1. 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 Supressor 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 1α y exón 1β. Los exones 1α, 2 y 3 codifican para la proteína p16^{INK4a} mientras que ARF combina los exones 1β, 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 10**).

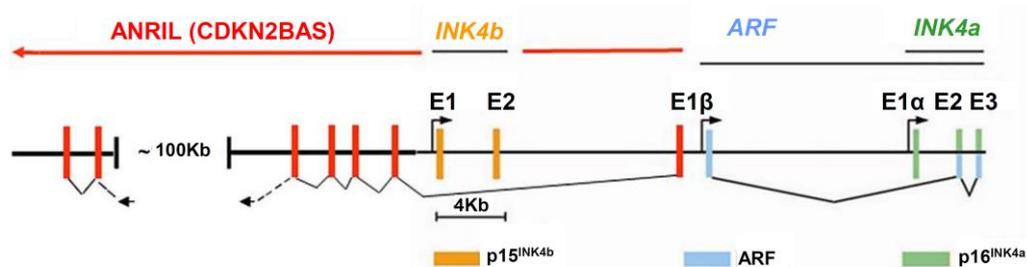


Figura 10. Estructura del locus *Ink4/Arf*. En humanos, ratones y ratas, la estructura del locus *Ink4/Arf* está altamente conservada. Los exones 1 y 2 del gen CDKN2B (*Ink4b*) codifican para la proteína p15^{Ink4b}. El gen CDKN2A (*Ink4a/Arf*) origina dos transcritos que codifican para las proteínas 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 1α es específico de p16^{INK4a} y el exón 1β es específico de ARF. En humanos, existe un cuarto gen CDKN2BAS (*del inglés, CDKN2B AntiSense*) que codifica para un ARN antisentido no codificante.

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 1β, 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).

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).

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

Durante el ciclo celular la célula duplica su contenido y se divide para generar dos células hijas: cuando una célula en fase G0 de quiescencia o no proliferativa recibe estímulos mitogénicos entra en fase G1. Tras esta fase se produce la entrada en fase S o de síntesis de ADN a la que le sigue la fase G2 en la cual la célula se prepara para la 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 que determina el momento en que la célula deja de depender de señales mitogénicas extracelulares para progresar en el ciclo (**Figura 11**).

En eucariotas el ciclo celular está regulado por una familia de protein-quinasas conocidas como quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, *del inglés, Cyclin Dependent Kinase*) y su asociación con subunidades reguladoras llamadas ciclinas provoca la entrada y salida de cada fase del ciclo celular (Morgan, 1995).

A su vez, durante la fase G1, los complejos CDK-ciclinas están regulados por una serie de polipéptidos conocidos como inhibidores de CDKs (CKIs, *del inglés Cyclin Kinase Inhibitor*) que, en mamíferos, se dividen en dos familias: la familia Cip-Kip (*del inglés, CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*) que comprende tres componentes: p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, y la familia INK4 (*del inglés, Inhibitors of CDK4*) con cuatro miembros, p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} y p19^{Ink4d}. Éstos últimos se unen específicamente a las quinasas CDK4/6 evitando la formación de los complejos CDK4/6-ciclina D y inhibiendo, por tanto, la proliferación celular por parada del ciclo en G1 (Hannon and Beach, 1994; Serrano, 1997). Cada componente 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.

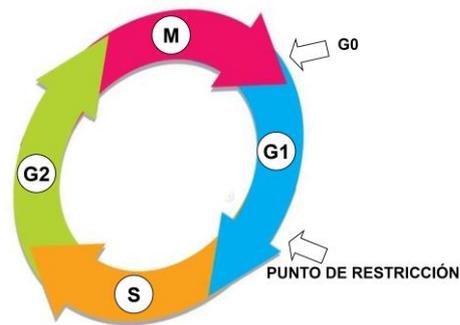


Figura 11. Fases del ciclo celular. Tras recibir estímulos extracelulares mitogénicos la célula entra en fase G1. En mamíferos, la transición más relevante es G1/S controlada a nivel del llamado punto de restricción. En las dos siguientes fases las células llevan a cabo la replicación de los cromosomas en la fase S y su segregación en la fase M. 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.

Como se ha mencionado anteriormente $p16^{Ink4a}$ y $p15^{Ink4b}$ junto con el gen ARF y el ARN antisentido *Anril*, constituyen el locus *Ink4/Arf*. 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 codificantes del locus *Ink4/Arf*, los CKIs $p16^{Ink4a}$ y $p15^{Ink4b}$ inhiben la proliferación celular formando complejos con CDK4 y CDK6, los cuales bloquean la hiperfosforilación de RB necesaria para la progresión del ciclo celular mientras que 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 12**). 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 antienvjecimiento 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). Además ARF, posee un

papel en la proliferación, ya que a través de la proteína p53, activa la CKI p21 e impide la formación de los complejos ciclina E-CDK2 resultando en la parada de la progresión del ciclo.

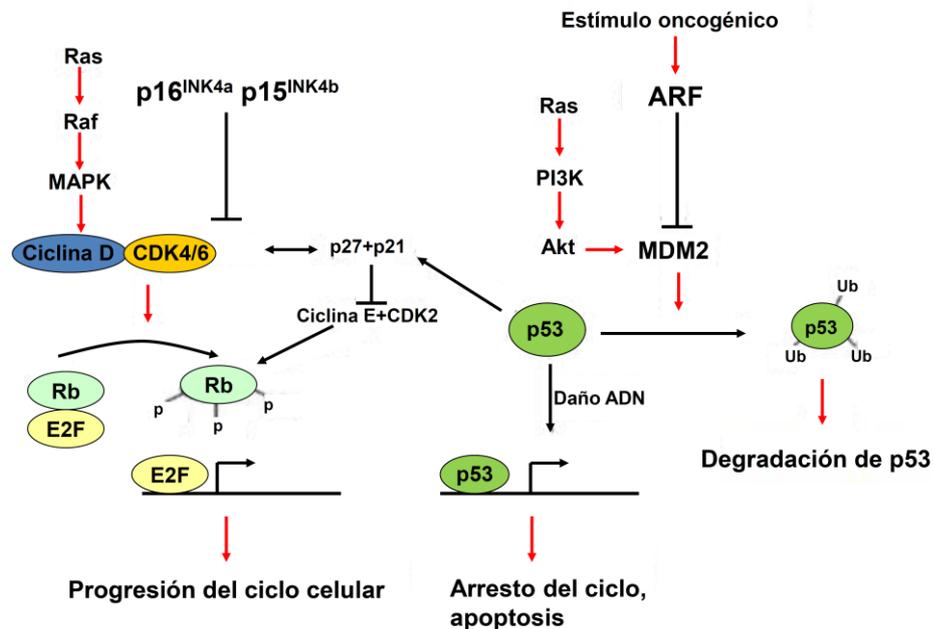


Figura 12. Modulación del ciclo celular mediada por los productos génicos del locus *Ink4/Arf*. p15^{INK4b} y p16^{INK4a}, dos de los cuatro CKIs de la familia INK4, inhiben la proliferación celular al unirse a CDK4/6 e impedir la fosforilación de Rb. ARF provoca la acumulación de la proteína p53 al 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 (*Adaptado de Berger, 2007*).

Por otro lado, 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. 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).

3.3. Papel del locus *Ink4/Arf* en las enfermedades asociadas a la edad.

Estudios de asociación génica 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 un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cánceres (Debniak et al., 2005; Kumar et al., 2001; Shete et al., 2009). Estas asociaciones genotipo-enfermedad han sido replicadas en múltiples estudios independientes (Burd et al., 2010; Consortium, 2007; Doria et al., 2008; Hannou, 2015; Liu et al., 2009; Samani et al., 2007; Visel et al., 2010). Además, son independientes de factores de riesgo cardiovascular “clásicos”, como la hipertensión, la obesidad, el tabaquismo o las hiperlipidemias (**Figura 13**).

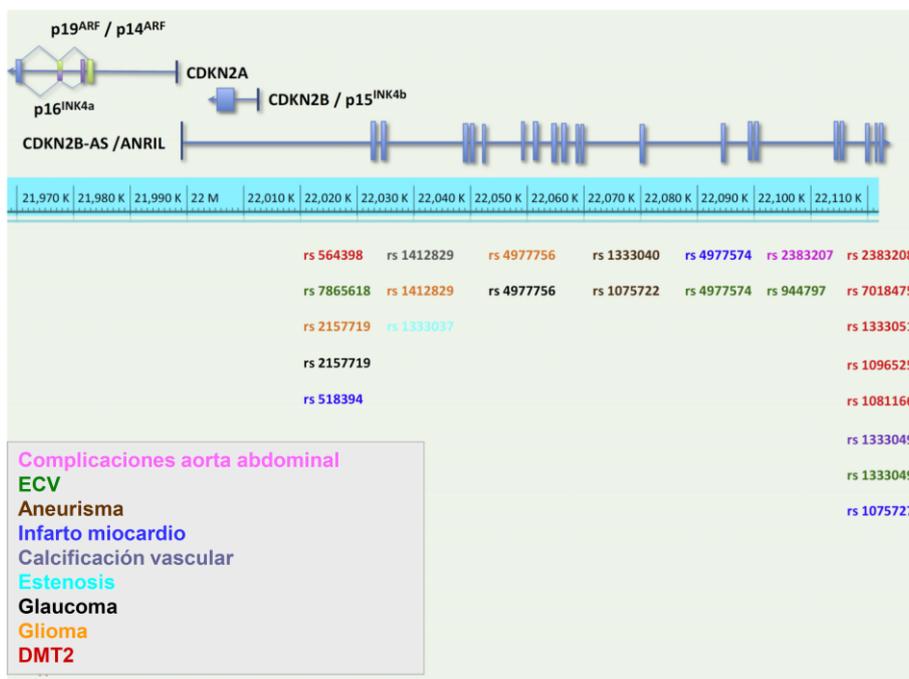


Figura 13. Principales SNPs asociados a ECV, DMT2 y otras complicaciones. Organización genómica del locus y sus productos génicos. Diferentes SNPs se asocian con complicaciones de la enfermedad cardiovascular (ECV), diferentes tipos de cáncer y DMT2 (Hannou, 2015).

Algunos de los estudios humanos sobre las variantes genéticas anteriores mostraron que polimorfismos en el gen *Cdkn2b* se asocian con el índice HOMA-RI (Ruchat, 2009) mientras que en otros se vincula el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos con variantes en el gen *Cdkn2bas* (Bochenek et al., 2013). Otras

investigaciones han vinculado SNPs asociados a ECV con cambios de expresión en *Anril* y *Cdkn2a/2b* (Congrains et al., 2012). En la misma línea, Liu y colaboradores mostraron que SNPs asociados a un mayor riesgo de aterosclerosis producen una menor expresión de los transcritos de *Cdkn2a* en células T (Liu et al., 2009). Estos datos sugieren un papel protector del locus *Ink4/Arf* en enfermedades crónicas como son la DMT2 y la ECV.

Por otro lado, estudios experimentales en ratones han mostrado 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). Así, se ha demostrado que el declive de las células β con la edad ha sido atribuido en parte a un aumento de expresión del locus (Krishnamurthy et al., 2006). Sin embargo existen varias evidencias de 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). Por otro lado la inactivación de BP1 que desestabiliza ARF, altera la homeostasis de las células β , indicando que la vía proapoptótica mediada por ARF juega un papel crítico en la DM (Kon et al., 2012). Así, se ha propuesto que la expresión de *Ink4/Arf* inducida por la edad podría representar una respuesta defensiva antienvjecimiento 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 (Collado et al., 2007; Gonzalez-Navarro et al., 2010; Kuo et al., 2011).

3.4. El ratón transgénico *SuperInk4/Arf*

El estudio del ratón *SuperInk4/Arf* ha permitido esclarecer algunos mecanismos acerca de la protección del locus frente a las diferentes enfermedades. El ratón *SuperInk4/Arf* fue generado por inyección de un cromosoma artificial con la estructura completa de los tres genes $p15^{Ink4b}$, ARF y $p16^{Ink4a}$ en oocitos fertilizados (Matheu et al., 2004). Los ratones resultantes poseen una dosis génica extra del locus que se expresa y comporta como el gen endógeno sin tener afectada la viabilidad o la fertilidad. Así, los ratones *SuperInk4/Arf* muestran un incremento moderado en la expresión de los productos génicos $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$ y ARF en varios tejidos a edades avanzadas. Los ratones transgénicos *SuperInk4/Arf* con ganancia de función del locus

Ink4/Arf, muestran también resistencia frente al cáncer inducido tanto por agentes químicos como al cáncer espontáneo asociado al envejecimiento y expresan diferentes marcadores anti envejecimiento y una esperanza de vida y un envejecimiento normal (Matheu et al., 2009; Matheu et al., 2004). Estudios recientes en nuestro laboratorio demuestran que los ratones transgénicos *SuperInk4/Arf* están protegidos frente a las alteraciones en la homeostasis de la glucosa asociado a la edad (Gonzalez-Navarro et al., 2013). Además en los ratones *SuperInk4/Arf* se observó una mejora de la sensibilidad a la insulina asociado a un aumento en la señalización mediada por PI3K/IRS2/AKT en hígado, corazón y músculo esquelético (Gonzalez-Navarro et al., 2013).

4. PAPEL DE LA LIPASA HEPÁTICA EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

4.1. Papel de la lipasa hepática en el metabolismo de las lipoproteínas y en la ECV

El gen de la lipasa hepática conocido como LIPC (*del inglés Lipase, hepatic*) se encuentra localizado en el cromosoma humano 15q21-q23 y en el cromosoma 9 en el ratón. La lipasa hepática (HL, *del inglés hepatic lipase*) es una glucoproteína serina hidrolasa de 64 kDa que se sintetiza en el hígado, actúa como un homodímero sobre la superficie endotelial del espacio de Disse y se ancla al endotelio vascular a través de proteoglicanos de heparán sulfato (Santamarina-Fojo et al., 2004; Teslovich et al., 2010).

La HL actúa como una enzima lipolítica que hidroliza triglicéridos y fosfolípidos, presentes en las lipoproteínas circulantes en plasma, liberando diglicéridos, lipofosfolípidos y ácidos grasos libres y transformándolas en partículas más pequeñas y densas (**Figura 14**). Así, pacientes con deficiencia en HL presentan hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia y acumulan quilomicrones remanentes, VLDLs (*del inglés very low density lipoproteins*), LDLs ricas en triglicéridos y HDLs entre otros, y predisponen a los sujetos a desarrollar aterosclerosis y ECV. Ratones deficientes para HL presentan un incremento en las concentraciones plasmáticas de c-HDL y fosfolípidos y ratones doble deficientes en *apoE^{-/-}HL^{-/-}* acumulan LDLs, VLDLs y HDLs. La HL también modula las concentraciones de c-HDL transformando las HDL₂ ricas en fosfolípidos en HDL₃.

Además de su función lipolítica, HL participa en el metabolismo lipídico y en la captación celular de lípidos. Actúa como un ligando que facilita la captación de lipoproteínas por receptores de superficie celular (LDLR, *del inglés LDL receptor*, LRP, *del inglés LDLr-related proteína* y el receptor basura SR-B1 *del inglés, scavenger receptor B1*) y por proteoglicanos (**Figuras 14, 15**). Estudios *in vitro* han demostrado que la HL provoca un aumento de la captación de quilomicrones, quilomicrones remanentes, VLDL, LDL y HDL implicando en este proceso tanto a los receptores de superficie como a los proteoglicanos de superficie. De hecho, estudios en ratones que expresan sólo la forma catalíticamente inactiva de la HL, HL-145G, en ratones *apoE*^{-/-} *HL*^{-/-} y *LDLR*^{-/-} *HL*^{-/-} muestran concentraciones de VLDLs, LDLs y HDL significativamente disminuídas (Freeman et al., 2007; González-Navarro et al., 2004).

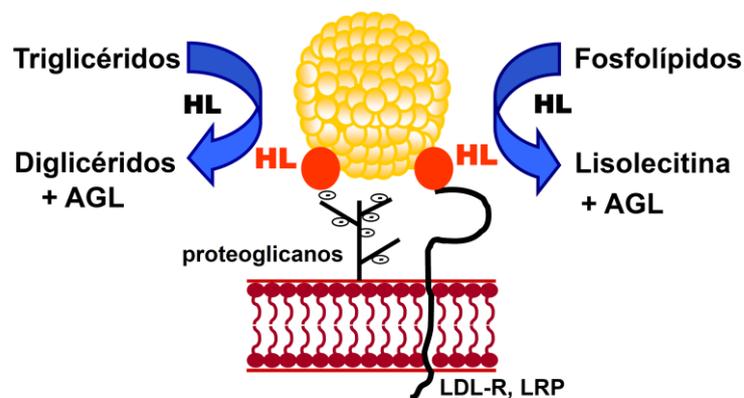


Figura 14. Esquema de la función clásica de la lipasa hepática como un enzima lipolítico y como ligando. La lipasa hepática actúa como un enzima lipolítico hidrolizando triglicéridos y fosfolípidos, presentes en las lipoproteínas circulantes en plasma. Por otro lado actúa como un ligando facilitando la interacción entre lipoproteínas circulantes en plasma y receptores de superficie celular y proteoglicanos (Adaptado de Santamarina-Fojo, 2004).

Sin embargo, el efecto del papel de la HL en el metabolismo lipoproteico y en la captación celular de lípidos sobre la aterosclerosis es variable siendo aterogénico o antiaterogénico dependiendo del entorno metabólico estudiado y la relevancia de las funciones ligando o lipolítica en dichos entornos (Freeman et al., 2007; Hime et al., 2008; Nong et al., 2003) (González-Navarro et al., 2004).

Así, una excesiva función lipolítica de la HL se relaciona con su papel proaterogénico. Esto es debido a la generación de LDLs pequeñas y densas (sdLDL), las cuales son retenidas por el subendotelio vascular más fácilmente y generan células espumosas, y a los bajos niveles de colesterol HDL. Por el contrario, el aumento en tamaño y densidad de las partículas LDL en situaciones de baja actividad en ocasiones es ateroprotectivo ya que estas partículas no son retenidas en el

subendotelio vascular y finalmente son eliminadas en el plasma mediante la actividad ligando de la HL. Los bajos niveles o actividad de la HL, elevan los niveles de c-HDL creando un ambiente antiaterogénico (Brunzell et al., 2011; Carr and Brunzell, 2004; Santamarina-Fojo et al., 2004) (**Figura 15**). Así, en humanos el efecto neto de la HL en la progresión de la aterosclerosis y la ECV depende del fenotipo lipoproteico subyacente (Brunzell et al., 2011). Los altos niveles de HL son beneficiosos en pacientes con hipercolesterolemia (Dugi et al., 2001) ya que disminuye los niveles de colesterol, pero perjudicial en sujetos con hipertrigliceridemia, obesidad central y RI (Brunzell et al., 2011; Teran-Garcia et al., 2005; Zhang et al., 2006) donde la actividad de la HL es muy elevada y genera fácilmente sdLDLs.

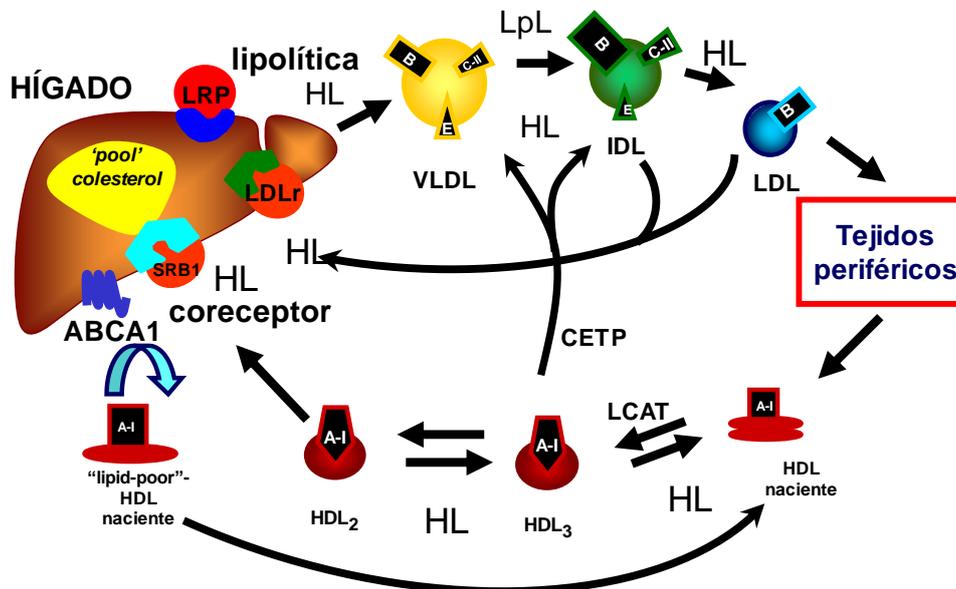


Figura 15. Esquema de los múltiples papeles de la lipasa hepática en el metabolismo de las lipoproteínas y en la captación de lípidos en el hígado y en el resto de tejidos periféricos presentes en la pared del vaso. La HL juega un papel importante en la determinación del tamaño y densidad de partículas LDL y HDL. HL hidroliza TG y fosfolípidos presentes en las lipoproteínas plasmáticas. Además, durante la lipólisis, una pequeña fracción de HL se une a proteoglicanos presentes en la superficie celular (Adaptado de Santamarina-Fojo, 2004).

Aparte de su papel en el metabolismo de lípidos, otros estudios han mostrado que la HL juega un papel relevante en la aterosclerosis actuando sobre las células inflamatorias siendo su efecto neto también variable (Gonzalez-Navarro et al., 2002; Hime et al., 2008; Nong et al., 2003). Así, la inactivación génica de la HL en la línea meeloide de ratones *apoE*^{-/-} y ratones transgénicos para la LCAT (*del inglés, lecithin*

cholesterol acyltransferase) mediante trasplantes de médula ósea, disminuye significativamente la aterosclerosis, indicando un papel proaterogénico de la HL, ya que la expresión de la HL en la pared arterial resulta en un aumento de la producción de ácidos grasos libres, incremento de la captación de colesterol, retención de LDL en el subendotelio vascular y el reclutamiento de macrófagos. La captación de LDL oxidadas disminuye significativamente en macrófagos peritoneales aislados de ratones *HL-/-* comparado con controles, sugiriendo que la HL podría incrementar la captación de lípidos por el aumento de la interacción de lipoproteínas con receptores de macrófagos, debido a su papel como ligando o coreceptor. La acumulación de colesterol por los macrófagos promueve la formación de células espumosas y se altera la expresión génica de éstos promoviendo la aterosclerosis. Por lo tanto, además del papel como enzima lipolítico y como ligando, la HL modula el riesgo aterogénico, independientemente de cambios en el perfil lipídico en plasma, mediante la alteración de la acumulación del colesterol en los macrófagos (Nong et al., 2003). Por el contrario, en ratones transgénicos para CETP (*del inglés, cholesterol ester transfer protein*) y deficientes en el receptor de las LDLs, la ausencia de HL en la línea mieloide, producida mediante trasplante de médula ósea, agrava la aterosclerosis, indicando un papel antiaterogénico de la HL (Hime et al., 2008).

4.2. Papel de la lipasa hepática en la DMT2

Estudios genéticos en humanos han asociado polimorfismos en el gen de la HL en pacientes con DMT2 (Todorova et al., 2004) a un mayor riesgo de ECV, sugiriendo un papel relevante de la HL en la aterosclerosis en sujetos con DMT2 (Lopez-Rios et al., 2011; Zacharova et al., 2005; Zhang et al., 2006). Por lo tanto, variantes en genes que regulan el metabolismo de lípidos y lipoproteínas son genes candidatos para la diabetes. Así se ha mostrado que el polimorfismo G-250A del gen *Lipc* predice la evolución de un fallo en la tolerancia a la glucosa hacia la DMT2, por lo que el genotipo G-250G es un factor de riesgo para DMT2 (Todorova et al., 2004).

En estudios poblacionales, la dislipidemia relacionada con la RI caracterizada por hipertrigliceridemia, bajos niveles de colesterol HDL y niveles normales de colesterol LDL, pero predominio de sdLDL (**Figura 16**), es un factor de riesgo para el desarrollo de ECV. Además se han descrito dos fenotipos distintos de LDL, el fenotipo A, con una predominancia de partículas LDL grandes (ILDL), y el fenotipo B, con una

predominancia de partículas pequeñas y densas (sdLDL). El fenotipo B presenta además una mayor prevalencia en desordenes familiares en el metabolismo lipoproteico, obesidad, DMT2 y SMet. Este fenotipo se asocia con altos niveles en plasma de triglicéridos, niveles reducidos de c-HDL y una actividad elevada de la HL, y se considera relacionada con el riesgo de desarrollar ECV (Diffenderfer and Schaefer, 2014).

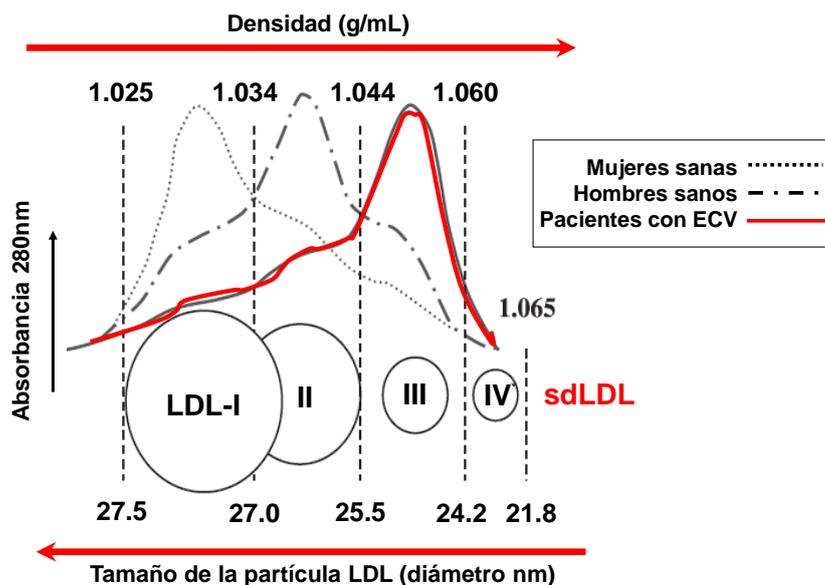


Figura 16. Perfil fenotípico de las partículas de LDL en sujetos sanos y pacientes con enfermedad cardiovascular. Los pacientes con ECV presentan un perfil de LDL más pequeñas y densas, que son altamente aterogénicas (Adaptado de De Vries, 2003).

5. LA ESTEATOSIS HEPÁTICA

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, *del inglés, non-alcoholic fatty liver disease*) es un problema de salud que afecta ya a un 30% de los adultos y a un número creciente de niños en países desarrollados (Cohen et al., 2011). La primera etapa en la NAFLD es la esteatosis hepática caracterizada por la acumulación de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos en forma de gotas lipídicas (LD, *del inglés lipid droplets*) y se diagnostica cuando las gotas lipídicas están presentes en más del 5% de los hepatocitos o bien cuando los niveles de triglicéridos superan el percentil 95 para personas delgadas, sanas, sin consumir alcohol y sin enfermedad hepática autoinmune o viral. La esteatosis hepática provoca, en algunos individuos, una respuesta inflamatoria que puede progresar a esteatohepatitis o NASH (*del inglés non alcoholic steohepatitis*) y a cáncer de hígado. Además, esta acumulación ectópica

de lípidos en el hígado se ha relacionado con el desarrollo de RI y DMT2 (Birkenfeld and Shulman, 2014; Cohen et al., 2011). De hecho se ha señalado a NAFLD como el evento hepático del SMet que cursa con RI y con hipertrigliceridemia.

Los LDs actúan como importantes reservorios de lípidos (lípidos neutros, ésteres de esteroles o triglicéridos) que proporcionan energía y sirven como sustratos para la síntesis de membranas celulares. Los LDs abarcan un amplio rango de tamaños (desde decenas de nm a varios micrómetros de diámetro) que varía en respuesta a diferentes señales celulares. La composición de la superficie es relevante en la regulación del tamaño del LD y su capacidad para interactuar con otros LDs u orgánulos, como el retículo endoplasmático (RE) (Farese and Walther, 2009; Pol et al., 2014; Wilfling et al., 2014).

La formación de los LDs puede ser por síntesis *de novo* o por fusión de LDs ya existentes. La formación *de novo* en organismos eucariotas ocurre desde el RE (Jacquier et al., 2011), donde se sintetizan los lípidos neutros. Un modelo en la formación de LDs se presenta en 3 etapas: (1) síntesis de lípidos neutros, (2) formación de la lente (acumulación de lípidos dentro de la membrana) y (3) formación de la gota (Wilfling et al., 2014) (**Figura 17**).

Introducción

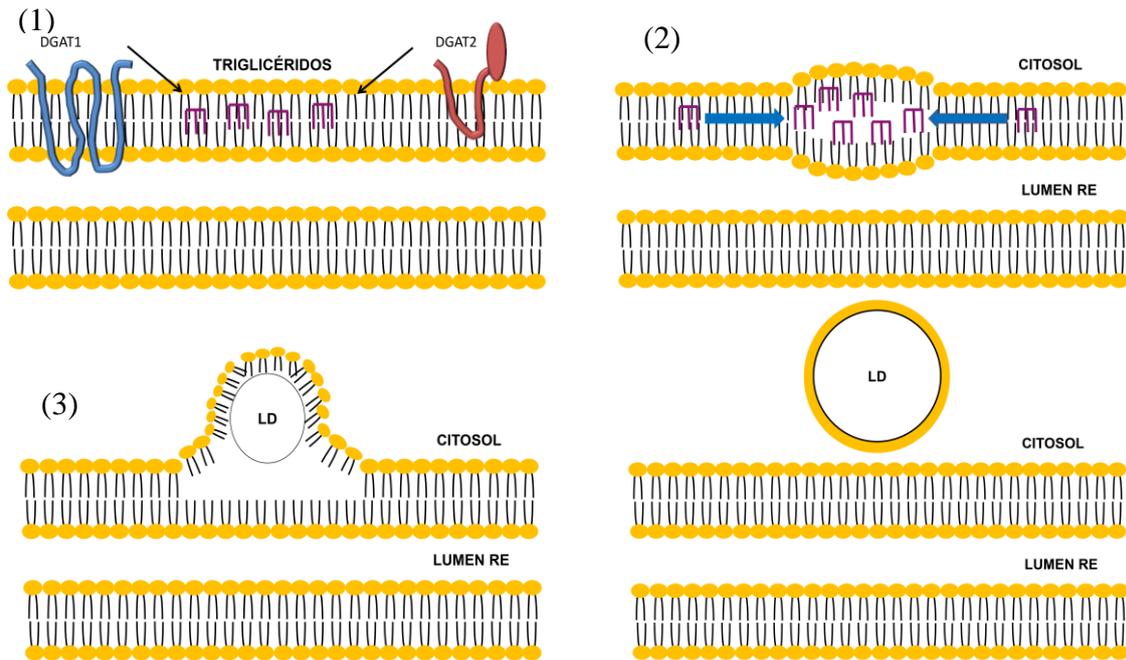


Figura 17. Fases del modelo de formación de las gotas lipídicas. (1) Los lípidos se sintetizan en el RE y se acumulan dentro de la bicapa. DGAT1 y DGAT2 son enzimas de membrana que utilizan acil-Coenzima A grasos y diacilglicerol para formar TGs. Los lípidos se mueven en la bicapa y pueden espontáneamente agregarse con proteínas de membrana o con otros lípidos. (2) Formación de la lente por la acumulación de lípidos. (3) Se deforma la bicapa y nace una gota lipídica en el citoplasma. La gota puede permanecer unida al RE o separarse completamente (*Adaptado de Wilfling, 2014*).

En condiciones normales el hígado almacena glucógeno y triglicéridos como fuente de energía. En condiciones de estrés (obesidad, desequilibrio en la nutrición o lesión hepática inducida por fármacos, entre otros) acumula un exceso de lípidos en forma de LD y su almacenamiento prolongado lleva al desarrollo de NAFLD (Sahini and Borlak, 2014). Esta acumulación de ácidos grasos o de sus metabolitos en los hepatocitos induce cambios en el metabolismo celular o lipotoxicidad que promueve el hígado graso y la activación de quinasas de estrés, MAPK, y otros factores de transcripción pudiendo llegar a afectar a la actividad de los receptores de la insulina modulando la sensibilidad a la hormona (Sahini and Borlak, 2014).

5.1. La relación entre esteatosis hepática, resistencia a insulina y el síndrome metabólico

La hipertrigliceridemia y altos niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA, *del inglés, non-esterified fatty acids*) en el SMet provocan una acumulación anormal de

lípidos en el hígado, en forma de esteatosis o NAFLD (Bugianesi et al., 2005). La NAFLD afecta hasta un 90% de personas con obesidad y cerca de un 70% a personas con sobrepeso (Marchesini and Marzocchi, 2007; Mitsutake et al., 2011). La NAFLD también se ha relacionado con la RI ya que un exceso de glucosa y triglicéridos produce el hígado graso (Anstee et al., 2013; Yki-Jarvinen, 2014). La RI afecta significativamente a la producción de glucosa endógena, lipólisis y oxidación lipídica. La correlación entre la oxidación de los lípidos y la producción/eliminación de glucosa sugiere que los defectos del metabolismo provienen de una lipólisis acelerada (el resultado inmediato de RI en el tejido adiposo) siendo responsable del aumento del suministro de ácidos grasos libres hepáticos y aumento de oxidación de lípidos. La afluencia de ácidos grasos libres plasmáticos a partir del tejido adiposo hacia el hígado representa la principal fuente de grasa intrahepática (62%-82% de los triglicéridos hepáticos). La contribución de la lipogénesis *de novo*, que es menor del 5% en personas sanas, aumenta al 26% en NAFLD. La insulina estimula al factor de transcripción unido a la membrana SREBP-1c, el cual activa la mayoría de genes involucrados en la lipogénesis. En estados de RI, la hiperinsulinemia puede inducir aún más estos factores de transcripción (Samuel et al., 2010; Samuel and Shulman, 2012).

La secuencia de eventos que conducen a la acumulación ectópica de triglicéridos se ha referido como *la hipótesis de desbordamiento*, según la cual la RI es el resultado de la incapacidad del órgano adiposo a acomodar el exceso de calorías. Una vez que la capacidad de la grasa celular para almacenar triglicéridos se excede, los desbordamientos de grasa a otros tejidos (músculo e hígado), donde el triglicérido intracelular interfiere con la señalización de la insulina, transporte de la glucosa, fosforilación, y la síntesis de glucógeno en músculo, aumenta la gluconeogénesis hepática (Bugianesi et al., 2005).

El aumento del flujo de los ácidos grasos libres desde el tejido adiposo a los órganos no adiposos, resultado del metabolismo anormal de la grasa, lleva a la acumulación de triglicéridos en el hígado y contribuye a la alteración del metabolismo de la glucosa y a la sensibilidad a la insulina en el músculo y en el hígado. Varios factores secretados o expresados en el adipocito contribuyen a la aparición de un estado proinflamatorio donde los mediadores liberados por las células inmunes y adipocitos pueden contribuir al daño hepático y a la progresión de la enfermedad del hígado graso, el cual puede estar limitado al hígado o ampliarse a lo largo del cuerpo (Birkenfeld and Shulman, 2014; Bugianesi et al., 2005).

El hígado graso también se correlaciona con otros componentes del SMet, independientemente de la obesidad, pudiendo aumentar el riesgo de DMT2 y aterosclerosis. El exceso de producción de glucosa, VLDLs, proteína C reactiva y factores de coagulación por el hígado graso podría contribuir al riesgo de padecer ECV (Birkenfeld and Shulman, 2014).

5.2. La esteatosis hepática y la inflamación

El exceso de grasa en los adipocitos, que ocurre en la obesidad y el sobrepeso, agrava la enfermedad del hígado graso aumentando la liberación de mediadores proinflamatorios como MCP1, IL6 y TNF α (Sahini and Borlak, 2014).

TNF α es una citoquina que media respuestas inflamatorias y está implicada en la patogénesis de diferentes enfermedades, incluyendo cáncer, artritis reumatoide, diabetes y enfermedades inflamatorias. Las vías principales activadas por TNF α incluyen caspasas, NF-kB y las proteínas MAPK. Las cascadas de señalización de las MAPK transducen una variedad de señales extracelulares que regulan las respuestas celulares implicadas en proliferación, diferenciación y muerte celular. Se han identificado tres grupos de MAPK: ERK, p38 y JKN. En general, ERK es activada por mitógenos y señales de diferenciación, mientras que JNK y p38 se activan por estímulos de estrés. TNF α puede activar los tres grupos de quinasas (Sabio and Davis, 2014).

Las MAPK activadas transforman un estímulo externo en la correcta respuesta fisiológica por la fosforilación de sustratos desregulados, incluyendo factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, proteínas involucradas en la translación del ARNm, y otras quinasas que contribuyen a la especificidad, diversidad y amplificación de la cascada de las MAPK (Sabio and Davis, 2014).

Las vías de señalización de JNK y p38 se nombran como quinasas activadas por estrés y son potencialmente activadas en células tratadas con TNF α (Davis, 2000).

OBJETIVOS

OBJETIVO 1. Estudiar el papel del locus *Ink4/Arf* (genes *Cdkn2a/2b*) en el desarrollo de resistencia a la insulina y en la diabetes mellitus tipo 2

1.1. Estudiar el papel del locus *Ink4/Arf* en el metabolismo de carbohidratos, en la funcionalidad del páncreas y en la homeostasis del hígado en ratones *Irs2+/-*

1.2. Estudiar el efecto de la sobreexpresión del locus *Ink4/Arf* en la inflamación asociada en ratones *Irs2+/-*

1.3. Estudiar la expresión del locus *Ink4/Arf* y caracterizar la inflamación asociada en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y con enfermedad coronaria arterial

OBJETIVO 2. Estudiar el papel de la lipasa hepática en el metabolismo de carbohidratos, en la esteatosis hepática y en la aterosclerosis diabética

2.1. Estudiar el papel de la HL en la homeostasis de la glucosa y en la esteatosis hepática

2.2. Estudiar el papel de la HL en la aterosclerosis acelerada por resistencia a insulina y en la inflamación asociada

2.3. Estudiar la expresión de la HL en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con síndrome metabólico con y sin resistencia a insulina

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 de la Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia-INCLIVA. El manejo de los ratones y los procedimientos experimentales siguieron la normativa vigente 2010/63/EU para el cuidado de animales de experimentación.

Para los estudios del papel del locus *Ink4/Arf* en ratones parcialmente deficientes en la proteína IRS2 (*Irs2*^{+/-}) se utilizaron ratones transgénicos *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf* (C57BL/6J) obtenidos mediante cruces de ratones con una copia extra del locus *SuperInk4/Arf* (Matheu et al., 2004) y ratones *Irs2*^{+/-} (C57BL/6J). Los ratones silvestres (*WT*, del inglés *Wild type*) resultantes de los cruces fueron utilizados como controles. El genotipado de los ratones se realizó mediante dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) para detectar la presencia de la copia extra del transgén *Ink4Arf* (Matheu et al., 2004) de forma independiente, usando los pares de cebadores T7-PAC/T7-tg1 y T7-PAC/T7-tg2 que se indican en la **Tabla 4**. La ausencia parcial del gen *Irs2* se detectó mediante PCR utilizando los cebadores y las condiciones indicados en la **Tabla 4**. Los ratones fueron alimentados con una dieta control (2.8% de grasa; PANLAB, Barcelona, España) hasta el momento del sacrificio a 1 año de edad y los estudios fueron llevados a cabo en machos.

En los estudios sobre el papel de la lipasa hepática en la aterosclerosis diabética se cruzaron ratones deficientes para HL, *HL*^{-/-} (JACKSON LABORATORIES, Bar Harbor, ME, USA), ratones *apoE*^{-/-} (CHARLES RIVER, Lyon, Francia) y ratones *Irs2*^{+/-} (todos en background genético C57BL/6J), para generar los grupos experimentales y controles. De manera similar a los estudios indicados arriba, los grupos experimentales fueron identificados mediante genotipado utilizando las condiciones y los cebadores que se indican en la **Tabla 4**. Los ratones machos y hembras de los cuatro grupos *apoE*^{-/-}-*Irs2*^{+/-}-*HL*^{+/+}, *apoE*^{-/-}-*Irs2*^{+/-}-*HL*^{-/-}, *apoE*^{-/-}-*Irs2*^{+/+}-*HL*^{+/+} y *apoE*^{-/-}-*Irs2*^{+/+}-*HL*^{-/-} fueron alimentados con dieta control (2.8% de grasa; PANLAB) y a los 2 meses de edad se reemplazó por una dieta con alto contenido en grasa y colesterol (AGAC), con propiedades aterogénicas (10.8% de grasa total, 0.75% de colesterol, S8492-E010, SSNIFF, Alemania) y no obesogénica durante 2 meses más.

Para las investigaciones sobre el papel de la lipasa hepática en la esteatosis hepática, se utilizaron ratones *HL*^{-/-} y *WT*. Desde el momento de su nacimiento, estos ratones fueron mantenidos con una dieta control (2.8% de grasa; PANLAB), y a los 2 meses de edad fue reemplazada por un dieta AGAC (10.8% de grasa total, 0.75% de colesterol, SSNIFF) durante 4 meses o se dejaron en dieta control durante 4 meses más. Estos estudios se llevaron a cabo en ratones macho y hembra.

Tabla 4. 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'-AGCTCTGGAGGTTACTTTCTAG-3')
INK4/ARF	T7-tg1 (5'-AGTCAGAGGGTGGATGGG-3') T7-tg2 (5'-AAGCACTGAACCACAAA-3') T7-PAC (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')
HL	813F (5'-ACTGGGCACAACAGACAATCGGC-3') 812R (5'-GCCAAGCTCTTCAGCAATATCAG G-3') 867F (5'-TCGGAGCAAAGTTCACCTAATTGG-3') 868R (5'-CTGTGATTCTCCAATCTGTTCTTCCCG-3')

GEN	CICLOS	DESNATURALIZACIÓN	EMPAREJAMIENTO	ELONGACIÓN
APOE	38	94°C, 5 minutos	94°C, 20 segundos	62°C, 30 segundos
IRS2	34	94°C, 1 minuto	94°C, 30 segundos	57°C, 30 segundos
INK4/ARF	4 28 29	94°C, 5 minutos	94°C 20 segundos 94°C 45 segundos 94°C 45 segundos	65°C, 45 segundos 65°C, 45 segundos 51°C, 45 segundos
HL	35	94°C, 1 minuto	94°C, 30 segundos	60°C, 30 segundos

1.2. Medidas metabólicas en ratones

1.2.1. Determinación de lípidos circulantes en plasma y distribución de la grasa corporal

Para determinar los niveles plasmáticos de lípidos los ratones fueron ayunados durante al menos 15 horas y no más de 20 horas, y se utilizaron kits comerciales. El plasma se obtuvo tras centrifugación de la sangre durante 30 minutos a 13500g, a 4°C usando como anticoagulante EDTA (Ethilenediaminetetraacetic acid Disodium Salt Dihydrate, SIGMA, St. Louis, EEUU).

Para la determinación de triglicéridos, se empleó el kit “*LabAssay Triglyceride*” y para la determinación del c-Total se empleó el kit “*LabAssay Cholesterol*” (WAKO, St. Louis, MI, EEUU) ambos basados en procedimientos enzimáticos que dan lugar a un producto azulado que se lee espectrofotométricamente a 600nm de longitud de onda. Los niveles de lípidos se determinaron a partir de una curva patrón con cantidades conocidas de cada uno de los lípidos. 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) (González-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).

Para la determinación del contenido de ácidos grasos libres, también conocidos como ácidos grasos no esterificados (NEFA) se empleó un kit colorimétrico enzimático “*Free Fatty Acid Quantitation Kit*” (SIGMA, St. Louis, EEUU) que determina los ácidos grasos de más de 8 átomos de carbono. El plasma se trató con acil-CoA sintetasa (ACS) durante 30 minutos a 37°C. Se formó acil-Coa junto con adenosin monofosfato (AMP) y Pirofosfato (PPi). A estos productos se añadió una mezcla de reactivos durante 30 minutos a 37°C en agitación, donde los acil-CoA se oxidaron por la acción de la acil-CoA oxidasa (ACOD) generando peróxido de hidrógeno. Éste reaccionó con 3-metil-N-etil-N-(hidroxietil)-anilina (MEHA) en presencia de peroxidasa dando un producto final de color púrpura que se lee a una longitud de onda de 570 nm. Para la cuantificación del color se utilizó una curva patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de ácido palmítico (1 nmol/μl).

Para medir la distribución de la masa grasa corporal, se extrajo del ratón la grasa inguinal, epididimal y mesentérica, se pesó en una balanza y se expresó como porcentaje del peso corporal de los ratones.

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

La tolerancia a la glucosa se determinó mediante los tests de tolerancia a la glucosa (referidos como TTG). Ratones ayunados 15-17 horas fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis de glucosa de 2g/Kg de peso corporal a partir de una solución estéril al 20% de glucosa (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU). Tras la infusión, los niveles de glucosa e insulina se analizaron a diferentes tiempos (tiempo 0, 15, 30,

60 y 120 minutos). Los niveles de glucosa se midieron en sangre utilizando un glucómetro (Ascensia Elite, BAYER, Leverkusen, Alemania) y 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 donde dos anticuerpos monoclonales están dirigidos contra determinantes antigénicos independientes de la molécula de insulina. Durante la incubación de 2 horas a temperatura ambiente (TA) 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 0.5M para dar un producto final con color que se lee espectrofotométricamente a una absorbancia de 450nm. Las concentraciones fueron determinadas a partir de una curva patrón con concentraciones conocidas de insulina, en la que se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras a cuantificar.

Los resultados se analizaron calculando el parámetro área debajo de la curva (AUC, *del inglés, Area Under the Curve*) que es el área resultante de la curva generada al representar la glucosa a diferentes tiempos (AUC_{glucosa}) y de la representación de la concentración de la insulina a diferentes tiempos (AUC_{insulina}).

1.2.3. Determinación de la sensibilidad a la insulina y del índice HOMA-RI para la evaluación de la resistencia a la insulina

Los estudios de tolerancia a la insulina se llevaron a cabo mediante tests de tolerancia a la insulina (TTI) en ratones ayunados durante 4 horas. Para ello se inyectó peritonealmente insulina recombinante (ACTRAPID 100UI/ml, NovoNordisk, Bagsvaerd, Alemania) a una dosis de 0.5U/Kg de peso corporal en los ratones *WT*, *Irs2+/-*, *Irs2+/-Superlnk4/Arf* y *HL-/-* y a una dosis 0.75U/Kg de peso corporal en los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL+/+*, *apoE-/-Irs2+/-HL-/-*, *apoE-/-Irs2+/-HL+/+* y *apoE-/-Irs2+/-HL-/-*. Tras la inyección se analizaron los niveles de glucosa en sangre según indicado anteriormente a los diferentes tiempos (basal, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos

según el experimento). Los resultados fueron analizados mediante el $AUC_{glucosa}$ resultante de la curva generada al representar la glucosa a los diferentes tiempos.

El índice HOMA-RI para la determinación de la resistencia a la insulina se determinó mediante la fórmula: glucosa plasmática en ayunas (mmol/l) x insulina plasmática en ayunas (μ U/L)/22.5.

1.3. Obtención y procesamiento de tejidos de ratón

Para la obtención de la aorta, corazón, hígado, páncreas y músculo esquelético, 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 los tejidos 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*) mediante una aguja 23G introducida en el ápice del corazón. Para los estudios de expresión, la aorta, el hígado y el músculo esquelético fueron congelados rápidamente en N_2 líquido hasta su procesado. Para los estudios de expresión en islotes, el páncreas fue sometido a digestión y aislamiento de islotes, según se indica más abajo, tras lavado con tampón de Krebs (Gonzalez-Navarro et al., 2013). Para el análisis de la aterosclerosis en la aorta y para los estudios histopatológicos, los tejidos fueron fijados *in situ* mediante perfusión de PFA al 4% (Paraformaldehyde, SIGMA, St. Louis, MI, EEUU). La aorta y el corazón fueron extraídos desde la inserción diafragmática y, tras la eliminación de la grasa adherida a la superficie externa de la pared arterial, ambos se fijaron con la misma solución de PFA 4% a 4°C durante 17-19 horas y procesados según se indica en los correspondientes apartados (Gonzalez-Navarro et al., 2007).

El procesado del corazón junto con la zona de inicio de la aorta para el análisis histopatológico consistió en la deshidratación en 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, incubación con parafina 15-17h e inclusión en parafina. La anatomía de la aorta y de las distintas regiones analizadas se muestra en la **Figura 18**.

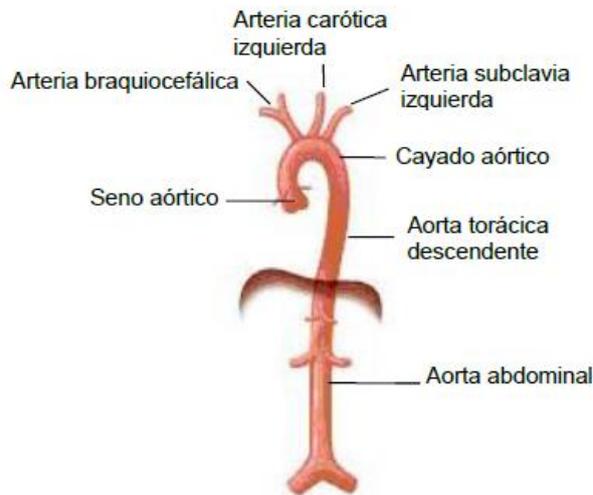


Figura 18. Anatomía de la arteria aorta. La arteria aorta nace en el ventrículo izquierdo y desde ahí se distinguen diferentes regiones: el seno aórtico o nacimiento de la aorta donde se encuentran las válvulas aórticas, el cayado aórtico, la aorta torácica descendente y la aorta abdominal. A la altura del cayado aórtico la arteria se ramifica en tres arterias menores denominadas braquiocefálica, carótida izquierda y subclavia izquierda.

Para las determinaciones histopatológicas en páncreas e hígado, los tejidos fueron fijados con PFA al 4% a 4°C durante 4 horas seguido de un lavado 15-17h con PBS previos a la deshidratación. La deshidratación del páncreas y del hígado 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%, dos lavados de 7 minutos con etanol absoluto, dos lavados de 7 minutos con etanol absoluto/xileno (50/50) y dos lavados de 7 minutos con xileno tras lo cual se incluyó en parafina.

Los reactivos utilizados para las tinciones histológicas se indican en la **Tabla 5**. En las **Tablas 6 y 7** se detallan todos los anticuerpos y reactivos empleados en todas las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias.

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 la determinación de la extensión de la placa aterosclerótica *en face* en la aorta entera, la aorta y sus bifurcaciones se sometieron a tinción con el colorante de lípidos Oil Red O (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU). La aorta fijada con PFA 4% se sometió a dos lavados de 5 minutos en metanol al 78% con agitación suave y se

incubó durante 2 horas 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, la aorta con sus bifurcaciones se abrió longitudinalmente bajo una lupa estereoscópica Motic SMZ-143 (MOTIC MICROSCOPES, Xiamen, China) y se montó en un soporte con la ayuda de agujas. Una vez tomadas las imágenes, 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 con la ayuda del programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, versión 1.47v; Java 1.6.0_20).

1.4.2. Cuantificación de la aterosclerosis en la aorta

Para determinar el tamaño de la placa de ateroma en el seno aórtico e inicio de aorta se realizó tinción de hematoxilina/eosina en secciones de 5µm de grosor del corazón y la aorta ascendente incluidos en parafina. Previamente a la tinción, las secciones fueron hidratadas sometiénolas al proceso de hidratación siguiente: 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 la tinción con hematoxilina-eosina para la identificación de núcleos y citoplasma se siguió el siguiente protocolo: inmersión de los cortes durante 1 minuto en una solución comercial de hematoxilina de Harris (SIGMA), aclaramiento con agua (10 minutos), 2 lavados rápidos en solución de diferenciación (0.25% (v/v) de HCl en etanol al 70%), lavado de 1 minuto en una solución hidroalcohólica de eosina (SIGMA) al 50 %, deshidratación de gradación creciente y montaje con Eukitt (A10500, DELTALAB, Barcelona, España). La toma de imágenes de los cortes se realizó utilizando una cámara fotográfica Optikam-Pro5 Digital (OPTIKA, Barcelona, España) montada sobre un microscopio óptico (OPTIKA, Barcelona, España).

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 6 y 7**. Salvo que se indique lo contrario, todos los pasos se realizaron a TA. 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 Optikam-Pro5 Digital (OPTIKA, Barcelona, España) montada sobre un microscopio óptico (OPTIKA, Barcelona, España). En el caso de las inmunofluorescencias, la toma de imágenes se realizó utilizando una cámara fotográfica AxioCamHRc acoplada a un microscopio de fluorescencia invertido Axio ObserverA1 (ambos ZEISS, Barcelona, España). La cuantificación de los componentes de la placa de ateroma se realizó mediante morfometría computerizada utilizando la aplicación informática ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, versión 1.47v; Java 1.6.0_20).

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 técnica inmunohistoquímica 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 caballo al 5%. La incubación con el anticuerpo primario anti-Mac-3 diluido 1/200 en solución de bloqueo se realizó a 4°C durante toda la noche 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 Mac-3 relativo al área de lesión.

1.5.2. Cuantificación del contenido de células T en la placa de ateroma

Para la detección del infiltrado de células T en la lesión se realizó una inmunofluorescencia. Tras la hidratación del tejido según indicado anteriormente, las secciones histológicas fueron sometidas a exposición del antígeno en tampón citrato de sodio (10mM, pH 6.5 a alta presión y temperatura) y bloqueo de interacciones no específicas en suero de caballo al 5% durante 60 minutos a TA. Seguidamente las secciones fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con un anticuerpo policlonal humano frente al marcador CD3 diluido 1/75 en solución de bloqueo y, tras lavado con PBS, se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 diluido 1/200. La tinción nuclear se realizó con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Las muestras se montaron con Slow-Fade Gold (INVITROGEN). Tras la toma de imágenes y la cuantificación del contenido en células T, el resultado se expresó como el número de células positivas para el marcador CD3 en la lesión.

1.5.3. Cuantificación de los macrófagos que expresan el receptor de la linfotoxina- β (LT β -R) en la placa de ateroma

Para la detección doble del receptor de la linfotoxina- β (LT β -R) en los macrófagos F4/80, se realizó una inmunofluorescencia doble siguiendo el mismo procedimiento del apartado 1.5.2. Tras hidratación de los tejidos, desenmascaramiento de antígeno y bloqueo, las secciones histológicas se incubaron con una mezcla de anticuerpo policlonal anti-(LT β -R) diluido 1/200 en solución de bloqueo y anticuerpo anti-F4/80 diluido 1/50, durante toda la noche a 4°C, seguido de anticuerpos secundarios para cada uno de los marcadores utilizados, anti-rata IgM Alexa Fluor 594 y anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 diluidos 1/200, respectivamente. Tras el montaje de las muestras con Slow-Fade Gold, se tomaron las imágenes y el resultado se expresó como el contenido de células positivas para el LT β -R en la lesión.

1.5.4. Cuantificación de macrófagos proliferantes en la placa de ateroma

Los macrófagos proliferantes en la lesión se detectaron con una inmunofluorescencia doble utilizando el marcador de proliferación Ki67 y el marcador de macrófagos F4/80, la cual siguió el mismo procedimiento del apartado 1.5.2. Tras hidratación, desenmascaramiento de antígeno y bloqueo, las secciones se incubaron con una mezcla de anticuerpo primario monoclonal anti-Ki67 prediluido y anticuerpo anti-F4/80 diluido 1/50 durante toda la noche a 4°C. Se continuó con una incubación de 1 hora a TA con el anticuerpo secundario anti-rata IgM Alexa Fluor 594 y anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 respectivamente, ambos diluidos 1/200. Una vez montadas las muestras y fotografiadas, se cuantificó y expresó como número de células positivas doblemente para Ki67 y F4/80 en el total de la lesión.

1.5.5. Cuantificación del contenido de 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 5**).

Las secciones histológicas hidratadas se incubaron 4 minutos en una mezcla de disoluciones consistente en hematoxilina de Weigert al 1% en etanol absoluto, madurada durante una semana en oscuridad y en una disolución de 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 otro lavado de 5 minutos en ácido acético al 10% en agua destilada. A continuación se procedió a una incubación en la solución de verde luz al 1% en agua destilada durante 1 minuto y a un último lavado en ácido acético al 10%. Tras las tinciones 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 la captación de las imágenes y cuantificación del contenido de colágeno con la ayuda del programa Image J, el resultado se expresó como el porcentaje del área de la lesión positiva para verde luz respecto al total de lesión.

Tabla 5. Reactivos empleados en las tinciones histológicas de colágeno y hematoxilina/eosina.

REACTIVO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Hematoxilina de Weigert	PANREAC Barcelona, España	251344
Light Green SF Yellowfish	FISHER SCIENTIFIC Hampton, NH, EEUU	10675302
Acid Fucsin calcium salt	SIGMA St. Louis, MI, EEUU	857408
Phosphotungstic acid hydrate PA	PANREAC Barcelona, España	121033.1608
Hematoxylin Solution, Harris Modified	SIGMA St. Louis, MI, EEUU	HHS32
Eosin Y disodium salt	SIGMA St. Louis, MI, EEUU	E4382

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 los 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 anteriormente, seguido de un lavado final con agua ultrapura MilliQ de 5 minutos. La caracterización del páncreas se basó en técnicas de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia. La captura de imágenes de los cortes histológicos y las cuantificaciones de los componentes se realizaron mediante morfometría computerizada según lo indicado anteriormente.

1.6.1. Determinación de la masa de células β en los islotes pancreáticos

Para evaluar la masa de célula β, los islotes pancreáticos fueron identificados mediante inmunohistoquímica anti-insulina cuantificándose por cada páncreas 5-10 portas separados entre ellos 125µm.

El protocolo consistió en hidratación del tejido, desenmascaramiento del antígeno con tampón citrato sódico, y bloqueo de las interacciones inespecíficas con suero de caballo al 5%. Las secciones histológicas se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-insulina a 4°C durante toda la noche diluido 1/200 en solución de bloqueo seguido

de una incubación de 1 hora con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado a biotina dilución 1/300 en solución de bloqueo y de una incubación de 7 minutos con estreptavidina conjugada a HRP diluida 1/2 en PBS. Para el revelado de la tinción se empleó DAB y 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 captura de imágenes según lo indicado anteriormente. El análisis consistió en el conteo del número total de islotes por páncreas y del área relativa de los islotes por área total de páncreas para cada ratón.

1.6.2. Cuantificación de la proliferación en los islotes pancreáticos

La proliferación celular en los islotes fue evaluada mediante inmunohistoquímica frente a Ki67 como marcador de proliferación celular y mediante inmunofluorescencia doble frente a Ki67/insulina.

Tras la hidratación del tejido se procedió al desenmascaramiento del antígeno con tampón citrato sódico, bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol durante 5 minutos y bloqueo de las interacciones no específicas. Como anteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario de conejo anti-Ki67 prediluido durante toda la noche a 4°C. Tras lavados con PBS se procedió a la incubación durante 30 minutos con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado a biotina diluido 1/500, seguido de 7 minutos con estreptavidina conjugada a HRP diluida 1/2 y revelado con el sustrato DAB. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se hidrataron y se montaron con Eukitt. La proliferación se determinó como el porcentaje de células positivas para Ki67 con respecto al número total de células del islote.

La determinación de la proliferación mediante inmunofluorescencia doble insulina/Ki67 en el islote pancreático, consistió en la hidratación del tejido, exposición de antígeno en tampón citrato sódico y el bloqueo de interacciones no específicas e incubación a 4°C durante toda la noche con una mezcla de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina diluido 1/300 y anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki67 prediluido. Se continuó con una incubación de 60 minutos a TA con los anticuerpos secundarios anti-ratón IgG Alexa Fluor 594 y anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 diluidos 1/200 en solución de bloqueo. Tras el montaje de las muestras con Slow-Fade Gold,

se tomaron las imágenes con un microscopio invertido de fluorescencia y se cuantificó el número de células Ki67 positivas respecto al área de célula β .

1.6.3. Cuantificación de la relación α/β en los islotes pancreáticos

Para la cuantificación de la relación α/β , se llevó a cabo una doble inmunofluorescencia insulina/glucagón donde, tras la hidratación, la exposición de antígeno con tampón citrato sódico y el bloqueo de interacciones no específicas, las secciones histológicas se incubaron a 4°C durante toda la noche con una mezcla de anticuerpos primarios monoclonal de ratón anti-glucagón diluido 1/300 y anticuerpo policlonal de conejo anti-insulina diluido 1/200 seguido de una incubación con los anticuerpos secundario anti-ratón IgG Alexa Fluor 594 y anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 respectivamente diluidos 1/200. La tinción nuclear se realizó con 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) y las muestras se montaron con Slow-Fade Gold. Tras la captura de imágenes, el contenido de células α y células β , se expresó como la ratio α/β .

1.6.4. Cuantificación del contenido de células T y de focos inflamatorios

Para la cuantificación del contenido en células T, se realizó una inmunofluorescencia doble insulina/CD3. Tras la desparafinación, la exposición de antígeno, en este caso con tampón Tris EDTA (10 mM pH 9, a alta presión y temperatura) y el bloqueo de interacciones, las secciones histológicas se incubaron a 4°C durante toda la noche con una mezcla de anticuerpo de ratón anti-insulina diluido 1/200 y anticuerpo de conejo anti-CD3 diluido 1/50. Se siguió con la incubación de los anticuerpos secundarios anti-ratón IgG Alexa Fluor 594 y anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 durante 60 minutos. Tras el montaje de las muestras con Slow-Fade Gold, se captaron las imágenes según indicado anteriormente y la cuantificación se expresó como células positivas para el marcador de CD3 con respecto al total del área pancreática.

Para cuantificar el infiltrado inflamatorio en el páncreas de ratón, las secciones histológicas fueron hidratadas y teñidas con hematoxilina/eosina según se indica en el apartado 1.4.2. El infiltrado inflamatorio se expresó como porcentaje del área del foco inflamatorio con respecto al área total del islote.

1.7. Caracterización del hígado de ratón

Las inmunotinciones de hígado se realizaron en cortes histológicos de 5µm de grosor recogiendo cortes consecutivos. Para la desparafinación e hidratación, los cortes se sometieron de forma secuencial a lavados de xileno y alcohol crecientes según se ha indicado anteriormente, seguido de un lavado final con agua ultrapura MilliQ de 5 minutos. La caracterización del hígado se basó en técnicas básicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, la captura de imágenes se realizó como en los apartados 1.5. y 1.6.

1.7.1. Determinación de la esteatosis hepática

La determinación de la esteatosis hepática en el hígado de ratón, se llevó a cabo de dos maneras: mediante la cuantificación del contenido de lípidos en el tejido tras su disgregación y mediante la cuantificación de las gotas lipídicas en cortes histológicos del hígado.

Para la determinación del contenido lipídico en hígado, 100mg de tejido fueron sometidos a digestión y saponificación en 350µl de hidróxido de potasio etanólico durante toda la noche en un baño a 55°C. Tras la incubación y enrasado a un volumen final de 1000µl con H₂O:EtOH (50:50) las muestras se centrifugaron a 13500 g, 5 minutos y el sobrenadante se llevó a un volumen final de 1200µl de H₂O:EtOH (50:50). Un volumen de 200µl fue sometido a precipitación con 215µl de cloruro de magnesio (MgCl₂ 1M) 10 minutos en hielo y centrifugación 13500 g, 5 minutos. De este último sobrenadante se cogió un volumen de 6 µl para analizar el contenido en glicerol. Se utilizó el reactivo "*Free Glycerol Reagent*" (F6428, SIGMA St. Louis, MI, EEUU), donde el glicerol es fosforilado por adenosín trifosfato (ATP) formando glicerol-1-fosfato (G-1-P) y adenosín bifosfato (ADP) en la reacción catalizada por la enzima glicerol kinasa (GK). G-1-P es oxidado posteriormente por la glicerol fosfato oxidasa (GPO) a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La peroxidasa (POD) cataliza la reacción entre H₂O₂ con 4-aminoantipirina (4-AAP) y N-ethyl-N-(3-sulfopropil) m-anisidina (ESPA) para producir una quinoneimina que muestra una absorbancia máxima a 540 nm. El aumento en la absorbancia a 540 nm es directamente proporcional a la concentración de glicerol libre de la muestra. Para calcular el contenido de triglicéridos en el hígado se aplicó la fórmula para el contenido

en equivalentes de trioleína CTE(mg/dl)*415/200*0.012(dl)/peso en gramos (Norris et al., 2003).

Para la determinación de la esteatosis hepática mediante la acumulación de gotas lipídicas en el hígado de ratón, se realizó una tinción de hematoxilina/eosina según indicado en el apartado 1.4.2 en cortes histológicos hidratados de 5µm de grosor. Tras la tinción, los cortes fueron sometidos a deshidratación, montaje y captura de imágenes. Con la ayuda del analizador de imagen Image J, la esteatosis hepática se determinó por el tamaño medio de las gotas lipídicas por ratón y el número de células con gotas lipídicas por área total del hígado.

1.7.2. Determinación del contenido de macrófagos

Para determinar el contenido en macrófagos o células de Kupffer en hígado se realizó el mismo protocolo que en el apartado 1.5.1 pero utilizando el anticuerpo anti-F4/80. El contenido de macrófagos se expresó como número de células positivas para el marcador F4/80 con respecto al total de área del hígado.

Tabla 6. 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-insulina	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc9168
Anti-insulina	Policlonal de ratón	SIGMA St. Louis, MI, EEUU	I2018
Anti-Ki67 prediluido	Monoclonal de conejo	MÁSTER DIAGNOSTICA Granada, España	MAD-000310QD
Anti-F4/80	Monoclonal de rata	AbD SEROTEC, Kidlington, Reino Unido	MCA497G
Anti-RLT-β	Monoclonal de rata	ABCAM Cambridge, Reino Unido	Ab70063
Anti-CD3	Monoclonal de conejo	DAKO Dinamarca	A0452

Tabla 7. Anticuerpos secundarios y reactivos químicos empleados en técnicas de inmunohistoquímica

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
goat anti-rat IgG biotinilado	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-2041
Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG	LIFE TECHNOLOGIES Thermofisher, CA , EEUU	A21206
Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG	LIFE TECHNOLOGIES Thermofisher, CA , EEUU	A11005
Alexa Fluor 594 anti-rat IgM	LIFE TECHNOLOGIES Thermofisher, CA EEUU	A21213
goat anti-rabbit IgG biotinilado	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-2040
Streptavidina-HRP	LABVISION CORPORATION Thermofisher, CA , EEUU	TS-060-HR
DAB	AbD SEROTEC Oxford, Reino Unido	BUF021A
DAPI	LIFE TECHNOLOGIES Thermofisher, CA , EEUU	D1306
Slow-Fade Gold	INVITROGEN Carlsbad, CA, USA	S36936
Eukitt	DELTALAB Barcelona, España	A10500

1.8. Aislamiento de islotes pancreáticos, obtención de lisados proteicos y ensayo de secreción de insulina

Para el aislamiento de islotes pancreáticos los ratones se dislocaron cervicalmente y el páncreas se perfundió *in situ* con una solución de Krebs frío (NaCl 127mM, KCl 5mM, CaCl₂ 3mM, MgCl₂ 1.5mM, NaHCO₃ 24mM, Hepes 6mM, glucosa 2mg/ml, 0.1% albumina, equilibrado con 5% CO₂ en O₂). Posteriormente, el órgano se troceó, se retiró la grasa flotante y se realizó 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. Tras este proceso se procedió a lavado con Krebs frío y centrifugado (800g, 1minuto) repitiendo esta operación tres veces. Los islotes fueron aislados a mano bajo lupa estereoscópica y recogidos mediante centrifugación (500g, 1 minuto) para eliminar el exceso de Krebs y congelados en N₂ líquido y conservados a -80°C hasta la extracción proteica.

En los estudios de secreción de insulina, tras los lavados, los islotes fueron sometidos a un ensayo de secreción de insulina estimulada con glucosa. Para ello los

islotes (5 islotes/condición) fueron incubados durante 30 min a 37°C con una solución KRBH (NaCl 140mM, KCl 4.5mM, CaCl₂ 2.5mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 20mM, albúmina 0.1%) y 5.5 mM de glucosa. Tras la incubación y eliminación del sobrenadante los islotes fueron incubados durante 1h a 37°C con una solución KRBH con baja concentración de glucosa (2.8 mmol/L) o con KRBH con alta concentración de glucosa (16.7 mmol/L). Se realizaron seis ensayos por condición. Tras el ensayo las concentraciones de insulina secretada fueron determinadas en el sobrenadante mediante ELISA. Para el análisis del contenido de insulina en los islotes éstos fueron sometidos a lisis con un tampón ácido acético (5.75% acético albúmina 0.1%) a 100°C durante 10 min y, tras centrifugación (12000g, 10 min, 4°C), el sobrenadante fue recogido para la determinación de insulina por ELISA. El índice de estimulación se calculó como la relación de la insulina estimulada con glucosa y la insulina basal normalizada por el contenido de insulina.

1.9. Experimentos de señalización de insulina y estimulación con TNF α *in vivo*

Para los experimentos de señalización de insulina *in vivo* en los ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} y *Irs2*^{+/-}-*Superlnk4/Arf*, los ratones ayunados 15 horas fueron tratados con Tnf α (2 μ g/Kg de peso, PEPROTECH, London, Reino Unido) o vehículo mediante inyección intraperitoneal. Tras 2 horas de tratamiento los ratones fueron estimulados con insulina (ACTRAPID 100UI/ml, NovoNordisk, Bagsvaerd, Alemania) a una dosis de 0.25U/g de peso corporal 5 minutos. Tras la estimulación, los ratones fueron sacrificados rápidamente para la extracción del hígado y el músculo esquelético, que fueron congelados en N₂ líquido y guardados a -80°C para el análisis posterior de las proteínas fosforiladas según se indica en los apartados correspondientes.

1.10. Tratamiento *in vivo* con LIGHT

Para los experimentos de estimulación crónica con LIGHT, ratones *apoE*^{-/-}-*Irs2*^{+/-}-*HL*^{-/-} de 2 meses de edad, alimentados durante un mes con dieta AGAC, fueron tratados con la citoquina recombinante murina LIGHT (2 μ g/Kg de peso por día, PEPROTECH) o con suero salino como vehículo durante 28 días, administrándose la citoquina por vía subcutánea con mini bombas osmóticas (ALZET 2004) implantadas en la parte dorsal del ratón bajo anestesia inhalatoria (5% de isoflurano inicial y 2% de isoflurano durante el procedimiento). Tras el tratamiento, los ratones fueron

sacrificados para el análisis de las células circulantes en sangre mediante citometría de flujo y de la aterosclerosis *en face* de la aorta según se indica en los apartados 3.2. y 1.4.1 correspondientes.

2. ESTUDIOS *IN VITRO* EN CULTIVOS CELULARES

2.1. Obtención de cultivos primarios de ratón

La manipulación de cultivos celulares se realizó en campana de flujo laminar de bioseguridad nivel 11-A. El crecimiento de las células se llevó a cabo en condiciones constantes de temperatura (37°C) y de concentración de CO₂ (5%). En general, las células se cultivaron en medios con presencia de penicilina (100U/ml), estreptomycinina (0.1mg/ml) y amfotericina B (indicado como P/S/A).

Los macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) fueron 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 de diferenciación. La suspensión de los precursores se obtuvo a partir de la disgregación mecánica mediante dos pases a través de una aguja 19G de médula ósea del fémur y de la tibia. La suspensión celular obtenida se sembró en placas de cultivo estándar en medio de cultivo DMEM-P/S/A, 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 3x10⁶ 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 L929 mantenidas en confluencia durante 5-7 días.

2.2. Determinación de células espumosas

Los macrófagos peritoneales residentes de ratón se obtuvieron mediante el lavado de la cavidad peritoneal. Para ello, se inyectó en la cavidad peritoneal del ratón 10 ml de medio de cultivo DMEM-P/S/A a 37°C mediante una jeringa acoplada a una aguja 25G. A continuación, se empleó una aguja 19G insertada en la mitad del peritoneo para la elución del líquido peritoneal.

Las células espumosas fueron determinadas en el lavado peritoneal. La suspensión celular obtenida se sembró en cubreobjetos de vidrio de 1.5 cm de

diámetro durante 60 minutos a 37°C, tras lo cual se procedió a un lavado exhaustivo con PBS para la eliminación de células no adherentes. Después de la fijación con PFA 4% durante 20 minutos a TA y lavado con PBS, las células se tiñeron con Oil Red O durante toda la noche a 4°C. Para visualizar las células, se hizo una contratinción con hematoxilina y los cubreobjetos fueron montados con glicerol-gelatina. Para el análisis se consideró célula espumosa aquella con un contenido superior a 3 gotas lipídicas en el citoplasma. El resultado se expresó como porcentaje de células espumosas respecto al total de células

2.3. Ensayos funcionales *in vitro*

2.3.1. Estudios de proliferación y migración en macrófagos

La proliferación en MDMO fue evaluada mediante la incorporación durante 18 horas de BrdU (50 μ M, SIGMA) en los macrófagos crecidos sobre cubreobjetos de 1.5 cm de diámetro y fueron detectados con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU Alexa Fluor 488 diluido 1/200, en células fijadas 20 minutos con PFA 4%/PBS y permeabilizadas 30 minutos con 0.5% Triton X-100, 2M HCL. El total de células contadas se tiñeron con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Los cubreobjetos se montaron en portas con Slow-Fade Gold y fueron analizados con un microscopio de fluorescencia invertido Axio ObserverA1 (ZEISS). La proliferación se determinó como el porcentaje de células positivas para BrdU relativo al total de células contadas de un total de 10 campos seleccionados al azar, siendo el total del contaje entre 600 y 1000 células. La tasa proliferativa se obtuvo de la cuantificación de entre 4 y 6 cubreobjetos independientes por condición o tratamiento.

La actividad migratoria fue determinada por ensayo de cicatrización de herida (Martinez-Hervas et al., 2014) en placas con un 80% de confluencia. En el tiempo 0, se realizó una herida en el medio de la monocapa de células utilizando una punta de pipeta estéril, tras lo cual, las células fueron incubadas en 0.5% FBS/DMEM 10% LCM durante 24 horas. Las imágenes fueron tomadas a tiempo 0 y 24 horas. La migración se evaluó como área de la herida a tiempo 24h relativo al área de la herida a tiempo 0 (área t0 equivale al 100%). El área de herida fue el promedio de 4 campos analizados por pocillo independientes y de 8 pocillos independientes por genotipo y por condición.

2.3.2. Análisis de la apoptosis

La apoptosis en cultivos celulares se determinó mediante el análisis de las células haplodiploides en el perfil del ciclo celular obtenido mediante citometría de flujo de células teñidas con ioduro de propidio según lo descrito (Gonzalez-Navarro et al., 2010). Para inducir la apoptosis los MDMO fueron tratados con luz ultravioleta (UV) a 60 J/m^2 y tras 18 horas en cultivo, se recogió el sobrenadante, se tripsinizaron, y se recogieron por centrifugación (400g, 5 minutos). Las células se fijaron con etanol al 80% durante 30 minutos a -20°C y tras centrifugación (400g, 5 minutos) se incubaron con una disolución de ioduro de propidio (50 $\mu\text{g/ml}$, P4170, SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) en presencia de ARNasa A (0.25 mg/ml , R4642, SIGMA, St. Louis, MI, EEUU) durante 30 minutos a TA. Las células fueron sometidas a análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo obtenido con un citómetro FACSCanto (BD BIOSCIENCES, Franklin Lakes, NJ, EEUU). Las células haplodiploides apoptóticas fueron identificadas como la población Sub-G0 en análisis de ciclo celular. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado y en tres experimentos independientes por genotipo y condición.

2.3.3. Aislamiento de linfocitos y monocitos humanos

Las células mononucleares humanas de sangre periférica (CMSPs) fueron aisladas de muestras de sangre de voluntarios sanos con Lymphoprep™ (Axis Shield PoC, Oslo, Noruega), se sembraron en placas de cultivo estándar con medio RPMI 1640-P/S/A y 15% de FBS y se mantuvieron en una atmósfera al 5% de CO_2 a 37°C durante una hora. Después de esa hora, las células no adheridas que contenían los linfocitos se recogieron y se cultivaron en otras placas con el mismo medio mientras que las células adheridas, los monocitos, se mantuvieron durante 7-10 días para la diferenciación de macrófagos en presencia del mismo medio RPMI. Los linfocitos fueron tratados con 400 nM de insulina en medio RPMI-P/S/A, 15% FBS durante 3 días y posteriormente analizados por citometría de flujo y por análisis de expresión génica.

2.3.4. Experimentos de silenciamiento en macrófagos humanos derivados de monocitos

Para los experimentos de silenciamiento con ARN pequeño de interferencia (siRNA) los monocitos derivados de macrófagos (MDMAC) confluentes al 50-60%, fueron transfectados con siRNA control o con siRNA LIPC humano específico para el gen de la lipasa hepática (ON-TARGET PLUS, SMART POOL, DHARMACON, Lafayette, CO, USA) utilizando lipofectamina RNAiMAX (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA). Tras 48h de silenciamiento, los macrófagos silenciados fueron tratados con vehículo o con 100ng/ml de LIGHT humano en medio RPMI 1640-P/S/A y 0.5% FBS durante 24h y se analizó la expresión del ARNm de la *Hl* y de las citoquinas *Mcp1* y *Tnfa*. La pureza del cultivo de monocitos/macrófagos se confirmó por citometría de flujo.

3. CARACTERIZACIÓN DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN LOS MODELOS DE RATÓN

3.1. Estudio de las citoquinas circulantes

Para el estudio de las citoquinas circulantes, el plasma fue aislado de sangre heparinizada (10U heparina/ml) mediante centrifugación a 13500g a 4°C. Los niveles circulantes en plasma de las citoquinas TNF α , MCP1 e IL6 en ratón, se midieron mediante técnicas de ELISA utilizándose los "Quantikine ELISA kits" (R&D Systems Minneapolis, EEUU). Para la cuantificación de los niveles circulantes en plasma de LIGHT(TNFSF14) se utilizó un kit de ELISA específico de ratón "Mouse Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14(TNFSF14) ELISA kit" (Q9QYH9, CUSABIO, Wuhan, China). Para la realización del ensayo se siguieron las indicaciones de los diferentes fabricantes en cada caso.

3.2. Caracterización de las células circulantes mediante citometría de flujo en ratón

La caracterización de las células circulantes se realizó mediante citometría de flujo en sangre entera. Todos los anticuerpos y reactivos empleados en citometría se muestran en la **Tabla 8**.

Materiales y métodos

Para la caracterización de monocitos circulantes en ratón se incubó 10µl de sangre heparinizada con los anticuerpos murinos anti-CD45, anti-Ly6C y anti-CD115 durante 30 minutos a TA. Seguidamente se procedió al lisado de los eritrocitos con 250µl de solución de lisis 10 minutos a TA y las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (FACSVerse citómetro de flujo, BD BIOSCIENCES). Las subpoblaciones Ly6C^{low} y Ly6C^{hi} de monocitos fueron determinadas dentro de población doblemente positiva para los marcadores de monocitos CD115 y leucocitario CD45.

Para determinar los linfocitos circulantes en ratón, 10µl de sangre heparinizada fueron incubados durante 30 minutos con los siguientes anticuerpos: se añadió a la sangre 5 µl de tampón Brilliant Stain, seguido de los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8a, anti-CD69 y anti-CD3e. Tras lisado de los eritrocitos con 250µl de solución de lisis, se analizó mediante citometría de flujo. Para caracterizar los subtipos de linfocitos T CD4+, 100µl de sangre heparinizada fue marcada con un kit específico para la detección de células T reguladoras (CD4+Foxp3+) y células Th17 productoras de IL17 (CD4+IL17), "*Th17/Treg phenotyping kit*", donde primero se fijaron las células con 200µl del tampón Mouse Foxp3 Fixation durante 30 minutos a 4°C. Tras centrifugación a 300g, 5 minutos, se eliminó el fijador y se permeabilizaron las células con 200µl de tampón de permeabilización Mouse Foxp3 durante 30 minutos a TA en oscuridad. Tras varias centrifugaciones para eliminar el tampón y para lavar las células con PBS, se añadió 20µl del kit de anticuerpos mencionado anteriormente, dejándolo incubar 30 minutos a TA. Se repitió el lavado de las células mediante centrifugaciones y se lisaron los eritrocitos con 800µl de solución de lisis. Se analizó por citometría de flujo.

Tabla 8. Anticuerpos y reactivos utilizados para citometría de flujo en ratón

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-Ly6C PerCP	Producido en rata	BD PHARMINGEN Madrid, España	560525
Anti-CD115 APC	Producido en rata	BIOLEGEND, San Diego, CA, USA	135509
Anti-CD45 FITC	Producido en rata	BD PHARMINGEN Madrid, España	553079
Anti-CD4 Brilliant violet (BV)	Producido en rata	BD PHARMINGEN Madrid, España	562891
Anti-CD8a Brilliant violet (BV)	Producido en rata	BD PHARMINGEN Madrid, España	563068
Anti-CD69 phycoerythrin (PE)	Producido en hamster	BD PHARMINGEN Madrid, España	553237
Anti-CD3e allophycocyanin (APC)	Producido en hamster	BD PHARMINGEN Madrid, España	553066
Th17/Treg phenotyping kit		BD PHARMINGEN Madrid, España	560767
Brilliant Stain Buffer		BD PHARMINGEN Madrid, España	563794
Facs Lysing solution		BD PHARMINGEN Madrid, España	349202

4. ESTUDIOS EN PACIENTES

4.1. Características clínicas de los pacientes

El estudio se llevó a cabo conforme los principios éticos para la investigación médica que involucra a sujetos humanos, establecidos en la Declaración de Helsinki, y los protocolos fueron aprobados por el comité ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia. La presente investigación se realizó en individuos no relacionados que asistían a consulta externa del hospital (Hospital Clínico Universitario de Valencia-INCLIVA, Valencia, España) durante los años 2011-2015. Todos los sujetos fueron informados del presente estudio y se mostraron conformes a participar. Los sujetos fueron seleccionados por métodos oportunistas y se clasificaron como pacientes con SMet sin RI, SMet con RI, sujetos con DMT2, sujetos con DMT2 y enfermedad coronaria arterial (CAD, del inglés coronary artery disease). Para ser clasificados como SMet se siguió el criterio definido por el "National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATPIII)" (Grundy et al., 2005). Los pacientes con un índice HOMA-RI (*del inglés, Homeostasis Model Assesment*: niveles de glucosa en

ayunas (mmol/l) x niveles de insulina en ayunas ($\mu\text{U/ml}$) / 22.5) igual o superior a 3.2) fueron considerados RI (Martinez-Hervas et al., 2011). Para la inclusión en el grupo DMT2 la selección se basó en el criterio de la NCEP-ATP III de las guías AHA/NHLBI para la definición de DMT2 (Alexander et al., 2003) y, para la inclusión en el grupo de pacientes con DMT2-CAD, se utilizó además la guía europea de enfermedad coronaria arterial (Montalescot et al., 2013). Los criterios de exclusión fueron embarazo, lactancia y enfermedad inflamatoria crónica.

Las medidas de presión arterial, de índice de masa corporal y relación cintura-cadera fueron realizadas en consultas externas del Hospital Clínico de Valencia.

4.2. Evaluación de la arteria carótida humana por ultrasonido

Para la evaluación de la arteria carótida, se realizó una ecografía modo B de las arterias carótidas derecha e izquierda usando el instrumento '*Siemens Sonoline G40*' (SIEMENS MEDICAL SOLUTIONS, Erlangen, Alemania) equipado con un transductor lineal de banda ancha con una frecuencia de 7 a 10 MHz. Los pacientes fueron examinados en posición supina con la cabeza girada 45° al lado opuesto del escáner. Antes de obtener las imágenes para la medida del grosor íntima-media, los exámenes sonográficos de la ecografía en modo B y la Doppler en color, se realizaron en planos longitudinal y transversal para identificar la estenosis vascular. Se usó un protocolo de imagen estandarizado para la medida del grosor íntima-media de acuerdo con el consenso de Mannheim (Touboul et al., 2004). Con la dilatación de la carótida y los divisores de caudal como puntos de referencia anatómicos, el sonógrafo obtuvo imágenes de alta resolución de la carótida común (1cm proximal a la bifurcación), la bifurcación (entre dilatación y divisores de caudal), y la carótida interna (1cm distal al divisor caudal). El análisis de la arteria carótida externa e interna fue analizado por la presencia de placas ateroscleróticas y de la ecogenicidad. La placa de ateroma fue definida como una estructura focal que invade el lumen arterial al menos 0.5mm, 50% del valor circundante del grosor íntima-media, o un grosor igual o superior a 1.0 mm como medida de la interfaz media-adventicia a la interfaz íntima-lumen. La variable principal fue la media del grosor íntima-media carotídeo común (GIM-CC), definida como el promedio de las distancias entre la pared lumen-intima y media-adventicia tomadas bilateralmente en tres proyecciones diferentes (arteria carótida común derecha: 90°, 120° y 150°; arteria carótida común izquierda: 210°, 240° y 270°). Un

experimentado sonografo (S.M.-H.) realizó todas las exámenes. La variabilidad intraobservada fue examinada en 20 sujetos. El coeficiente de variabilidad de la media GIM-CC fue 5.2%.

4.3. Análisis bioquímicos, obtención de plasma y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)

Los parámetros bioquímicos fueron medidos según los protocolos estandarizados de los laboratorios del Hospital Clínico. Las muestras de sangre se recogieron después de 12-14 horas de ayunas, fueron extraídas de la vena antecubital y almacenados en tubos con EDTA o heparina (BD VACUTAINER, Plymouth, UK). Las medidas de insulina se determinaron por análisis radioinmunológico. El plasma fue aislado mediante centrifugación a 13500g a 4°C de sangre heparinizada (10U heparina/ml)

El aislamiento de las CMSPs, se realizó a partir de 5 ml de sangre con anticoagulante EDTA con el reactivo Lymphoprep™ (Axis Shield PoC, Oslo, Noruega) mediante centrifugaciones en gradiente de densidad siguiendo las especificaciones del fabricante.

4.4. Caracterización de las células circulantes mediante citometría de flujo

Para la caracterización de los leucocitos circulantes, se incubó 10 µl de sangre heparinizada procedente de los sujetos durante 30 minutos a TA con los siguientes anticuerpos: APC anti-human CD3, PE anti-human CD69 y un kit de anticuerpos "*Regulatory T cell Cocktail*". Para la determinación de los monocitos circulantes, la sangre se incubó 30 minutos a TA con los anticuerpos V450 anti-human CD14 y PerCP-Cy5.5 anti-human CD16 seguido de una incubación de 10 minutos con solución de lisis (Facs Lysing solution BD PHARMINGEN) y se analizó por citometría de flujo (FACSVerse Flow cytometer, BD BIOSCIENCES). Los anticuerpos empleados se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo en humanos

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-human CD3 (APC)	Producido en ratón	BD PHARMINGEN Madrid, España	555342
Anti-human CD69 (PE)	Producido en ratón	BD PHARMINGEN Madrid, España	555531
Anti-human CD14 (V450)	Producido en ratón	BD PHARMINGEN Madrid, España	560349
Anti-human CD16 (PerCP-Cy5.5)	Producido en ratón	BD PHARMINGEN Madrid, España	560717
Regulatory T cell Cocktail		BD PHARMINGEN Madrid, España	560249

4.5. Estudio de las citoquinas circulantes en plasma humano

Los niveles circulantes en plasma se midieron usando el método basado en la técnica directa de sándwich ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Para determinar los niveles circulantes en plasma de LIGHT(TNFSF14) se utilizó un kit "*ELISA DuoSET LIGHT development system*" (R&D Systems Minneapolis, MN, USA), y para la determinación de las citoquinas IFN γ , IL4 y IL17A se emplearon diferentes kits de ELISA (DIACLONE, Besancon, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

5.1. Obtención y cuantificación de extractos proteicos

Para la extracción de proteínas por muestra se utilizaron entre 50 mg y 100 mg de tejido, entre 50-70 islotes pancreáticos, 2 cayados aórticos y el *pellet* de CMSP procedente de 5 ml de sangre de pacientes. Los extractos proteicos fueron obtenidos por homogeneización utilizando un 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 200 μ M (SIGMA, St. Louis, MI, EEUU). Las suspensiones obtenidas se sometieron a tres pulsos de 30 segundos de homogeneización en un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA WERKE GMBH&Co., Staufen, Alemania) en el

caso de los cayados, y para el resto de tejidos se utilizaron micromorteros manuales. Todos los homogeneizados se sometieron a tres ciclos de congelación en N₂ líquido, descongelación en baño a 37°C y agitación durante 30 segundos. Los homogeneizados se centrifugaron a 13500g durante 30 minutos a 4°C para eliminar los restos de tejidos no disgregados. El sobrenadante resultante se cuantificó y se congeló -80°C para su posterior análisis por Western Blot.

La cuantificación de los extractos proteicos obtenidos se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) con Coomassie Blue G-250 (BIO-RAD, Munich, Alemania) siguiendo las instrucciones de la casa comercial que al reaccionar con la proteína produce un producto que se lee a 595 nm. Las concentraciones se obtuvieron a partir de una curva patrón con disoluciones de concentraciones conocidas de γ -globulina en un rango de entre 0.25 y 2 μ g/ μ L en la que se interpolaron los valores de absorbancia a 595 nm de las muestras.

5.2. Experimentos de co-inmunoprecipitación

Para los experimentos de co-inmunoprecipitación, 500 μ g de extracto proteico, fueron incubados durante 1 hora, en agitación orbital a 4°C, con 2 μ g/ml del anticuerpo policlonal de conejo anti-IRS1 en un volumen total de 500 μ L de tampón TNG, suplementado con inhibidores, seguido de una segunda incubación con 30 μ L de Protein A/G PLUS-Agarose al 50% en PBS (sc-2003, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) a 4°C durante 15-17h. Los inmunocomplejos fueron lavados (centrifugando entre los lavados durante 5 segundos a 16000g y a 4°C) con tampón TNG y recuperados para su análisis posterior. Las proteínas se eluyeron mediante ebullición con 25 μ L de tampón laemmli (tampón de carga con SDS y β -mercaptoetanol) y fueron sometidas a electroforesis en un gel al 8% de poliacrilamida según se indica en la siguiente sección.

5.3. 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 10 y 11**. 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 desnaturalizar 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 separación de las proteínas pTyr, IRS1 y phospho(p)Ser307IRS1 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 de las proteínas pAkt, AKT, pSAPK/JNK, SAPK/JNK, pp28 y p38, 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 Immobilon-P de Polifluoruro de vinilideno, PVDF (MERCK MILLIPORE, Madrid, España) 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 25 mM Tris, 192 mM 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 TA en agitación. La incubación con los anticuerpos primarios específicos indicados en cada caso 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 TA con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a HRP. La detección de las bandas proteicas se realizó mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL-Plus y empleando el sistema de adquisición y análisis de imagen Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (FUJIFILM, Tokio, Japón).

Tabla 10. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante Western Blot

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-fosfo-Akt (ser473)	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING TECHNOLOGY Boston, MA, EEUU	9271
Anti-Akt1/2	Policlonal de cabra	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-1619
Anti-phospho-Tyr	Monoclonal de ratón	MILLIPORE Madrid, España	05-321
Anti-IRS1	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING Boston, MA, EEUU	2382
Anti-IRS1	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-559
Anti-phosphoSer307IRS1		CELL SIGNALING Boston, MA, EEUU	2381
Anti-p15^{INK4b}	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING Boston, MA, EEUU	4822
Anti-p16^{INK4a}	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
Anti-phospho-SAPK/JNK	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING Boston, MA, EEUU	2994
Anti-SAPK/JNK (56G8)	Policlonal de conejo	CELL SIGNALING Boston, MA, EEUU	9258
Anti-β-actin	Monoclonal de ratón	SIGMA St. Louis, MI, EEUU	A5441
Anti-Phospho-p38	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-17852-R
Anti-p38	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-535
Hepatic lipase H-70	Policlonal de conejo	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-21007
Anti-α-tubulina	Monoclonal de ratón	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY SantaCruz, CA, EEUU	sc-8035

Tabla 11. Anticuerpos secundarios y reactivos empleados para la detección de proteínas mediante Western blot

ANTICUERPO		CASA COMERCIAL	REFERENCIA
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 detection kit		THERMO FISHER Barcelona, España	

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

6.1. Obtención y cuantificación de extractos de ARN

Para la extracción de ARN de MDMO en cultivo de tejido aórtico e hígado de ratón, y CMSPs de los pacientes se utilizó el reactivo TRIzol (INVITROGEN, Carlsbad, CA, EEUU).

Para las células se añadió 1ml TRIzol por cada 3.5 cm² de área celular y por cada muestra de CMSP resultante de 5 ml de sangre humana. En los tejidos se añadió 1ml TRIzol por cada 50-10mg de tejido 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 isopropanol (10 minutos) realizándose un lavado del ARN precipitado con etanol al 75%. Tras secado del precipitado, el ARN se resuspendió en agua libre de ADNasa/ARNasa (AMBION, Carlsbad, CA, EEUU) y se cuantificó en un Nanodrop (THERMO SCIENTIFIC, Waltham, MA, EEUU) mediante medida espectrofotométrica a 260nm de longitud de onda. La pureza se estimó mediante 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.

6.2. Retrotranscripción del ARN y análisis de la expresión génica median qPCR

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total, entre 0.5-1µg por muestra fueron retrotranscritos usando el kit comercial “Maxima First Strand cDNA Synthesis kit” (FERMENTAS) siguiendo el protocolo indicado. Para el análisis de la expresión génica por qPCR se utilizó el kit “Luminars Color HiGreen (High ROX)-qPCR Master MIX” (FERMENTAS) utilizándose un termociclador 7900Fast System (APPLIED BIOSYSTEM, Foster City, CA, EEUU). Los cebadores utilizados fueron diseñados mediante el programa Primer Express (APPLIED BIOSYSTEM) y se muestran en la **Tabla 12 y Tabla 13**. Los resultados fueron analizados con la aplicación informática suministrada por el fabricante (APPLIED BIOSYSTEMS) empleando el método del $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001). Para los diferentes genes, los niveles de ARNm fueron normalizados a los niveles del ARNm del control endógeno, el gen ciclofilina en ratones y el gen gapdh en humanos. La expresión de los genes fue relativizada a las muestras control (RQ=1) en cada experimento.

Tabla 12. Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica mediante PCR de ratones

PRODUCTO A AMPLIFICAR	CEBADOR	SECUENCIA 5'→3'
<i>Ciclofilina</i>	Forward Reverse	TGGAGAGCACCAAGACAGACA TGCCGGAGTCGACAATGAT
<i>p15^{Ink4b}</i>	Forward Reverse	AGATCCCAACGCCCTGAAC CCCATCATCATGACCTGGATT
<i>p16^{Inka}</i>	Forward Reverse	CGTACCCCGATTTCAGGTGAT TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT
<i>p19^{Arf}</i>	Forward Reverse	TCTTGAGAAGAGGGCCGCACC GAATCTGCACCGTAGTTGAGC
<i>Tnfa</i>	Forward Reverse	CCCACACCGTCAGCCGATTT GTCTAAGTACTTGGGCAGATTGACC
<i>Mcp1</i>	Forward Reverse	GCCCAGCACCAGCACCAG GGCATCACAGTCCGAGTC
<i>Il6</i>	Forward Reverse	CCCAACAGACCTGTCT CCAGTTTGGTAGCATCC
<i>Irs1</i>	Forward Reverse	CGGAGAGCGATGGCTTCTC GTTTGTGCATGCTCTTGGGTTT
<i>Jnk1</i>	Forward Reverse	CAACGTCTGGTATGATCCTTCAGA GCTCCCTCTCATCTAACTGCTTGT
<i>p38α</i>	Forward Reverse	GACTTTCCTGTTGGACAGCTT CAACAGACTGACCCGCTAAGG
<i>Light</i>	Forward Reverse	CTCCAGACTTGCCACCACA GGTGGCTGGAAACCAATGC
<i>Lt-βr</i>	Forward Reverse	GCAAGCCTGAGACCTAGTTTCAG CCTTGTGTCCGAGGCTCAAT

Tabla 13. Cebadores utilizados para el análisis de la expresión génica por qPCR en CMSPs de pacientes

PRODUCTO A AMPLIFICAR	CEBADOR	SECUENCIA 5'→3'
<i>Gapdh</i>	Forward Reverse	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>Lt-βr</i>	Forward Reverse	GAGGGACCCAATCCTGTAGCT TGTACCAAGTCAGGGAAGTATGGA
<i>HL</i>	Forward Reverse	CCCTGCCTCTGGTGATGATAA TGCCAGATCCAGTTTTCTAGC
<i>p15^{Ink4b} (Cdkn2b)</i>	Forward Reverse	GGCAGTCGATGCGTTCACT AGGGCCTAAGTTGTGGGTTCA
<i>p16^{Inka} variante1(Cdkn2a)</i>	Forward Reverse	TCTGGAGGACGAAGTTTGCA GGAAGCCTCCCCTTTTTCC
<i>p14^{Arf} variante4(Cdkn2a)</i>	Forward Reverse	GCTAAGTGCTCGGAGTTAATAGCA GGACCGCGGTATCTTTCCA
<i>ANRIL (Cdkn2bas)</i>	Forward Reverse	CATGGTGGCAGCAAGAGAAAAA TGATGGGTTTATCAGAGGTTTCC

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los datos cuantitativos se mostraron como la media±error estándar de la media, las variables cualitativas se mostraron como porcentaje y las correlaciones como datos individuales en puntos. 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). En los experimentos con más de dos grupos, se empleó un análisis de varianza unidireccional (test One-way ANOVA), y en los casos de dos variables categóricas independientes sobre una variable dependiente se utilizó al análisis bidireccional (test Two-way ANOVA) (Statview, SAS institute, Cary, EEUU). Para las variables cualitativas se utilizó el análisis de Chi-cuadrado y para las correlaciones de las variables continuas se determinó el coeficiente Spearman (Software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EEUU). El test de Grubbs se empleó para la identificación y eliminación de valores atípicos (Software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EEUU). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas para valores de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

1. Estudio del papel del locus *Ink4/Arf* en el desarrollo de resistencia a insulina y en la inflamación asociada en ratones *Irs2*^{+/-} y en pacientes con DMT2 y con enfermedad coronaria

1.1. Estudio del papel del locus *Ink4Arf* en el metabolismo de carbohidratos, en la funcionalidad del páncreas y en la homeostasis del hígado en ratones *Irs2+/-*

1.1.1. Estudio de la expresión del locus *Ink4Arf* en ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf*

Con el fin de comprobar la funcionalidad de la dosis génica extra del transgen en los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf*, se estudió la expresión de las proteínas del locus mediante análisis de Western blot. De acuerdo con estudios previos (Gonzalez-Navarro et al., 2013; Matheu et al., 2009), la expresión de las proteínas p15^{Ink4b} y p16^{Ink4a} aumentó en el hígado de los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* de un año de edad (**Figura 19A**) en comparación con la de los ratones *Irs2+/-* ($p < 0.03$ y $p < 0.02$, respectivamente) y la de los ratones *WT* ($p < 0.003$ y $p < 0.0004$, respectivamente). No se observaron cambios significativos en la proteína p19^{Arf} (**Figura 19A**). De manera similar, el análisis de los islotes pancreáticos mostró un aumento en la expresión de las proteínas p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a} y p19^{Arf} en los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* (**Figura 19B**, $p < 0.0008$, $p < 0.0002$ y $p < 0.05$, respectivamente) en comparación con los niveles de expresión observada en los ratones *WT*. Curiosamente, los ratones *Irs2+/-* también mostraron un aumento en la expresión de la proteína p15^{Ink4b} en los islotes (**Figura 19B**, $p < 0.008$) en comparación con los ratones *WT*. Además, los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* mostraron niveles superiores de expresión de la proteína p16^{Ink4a} en comparación con los ratones *Irs2+/-* (**Figura 19B**, $p < 0.0002$). Así, una dosis extra del locus en los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* incrementó la expresión de las proteínas del locus en los islotes pancreáticos.

Resultados

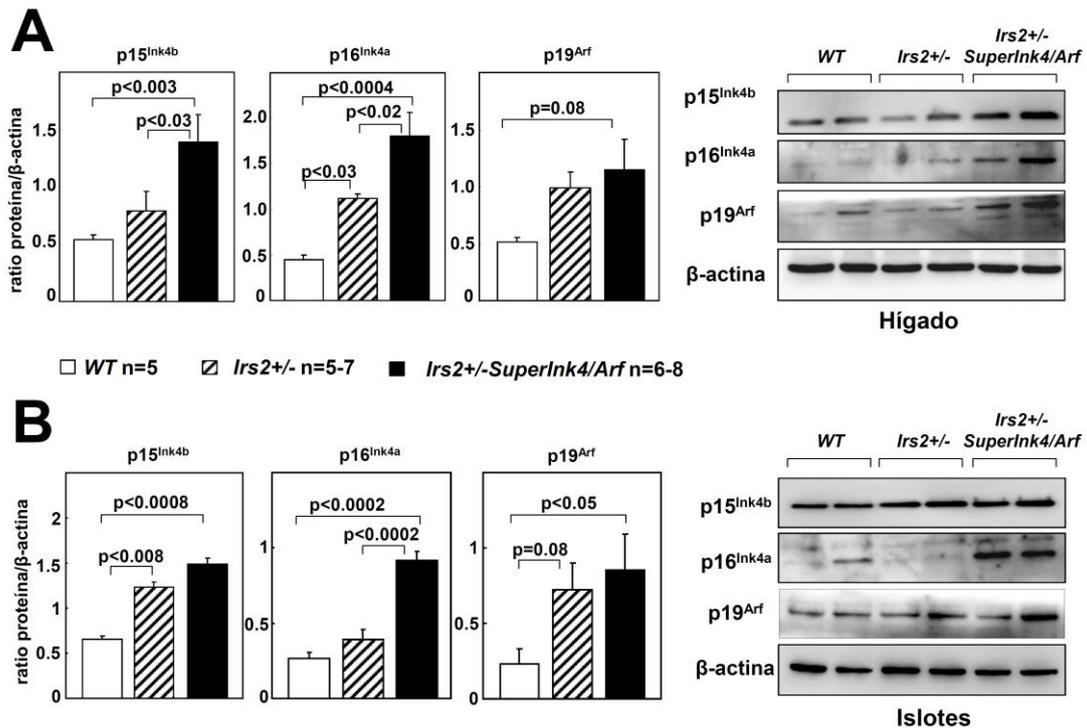


Figura 19. Expresión del locus *Ink4/Arf* en hígado e islotes pancreáticos de ratones WT, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf*. Niveles de expresión de las proteínas $p15^{Ink4b}$, $p16^{Ink4a}$, y $p19^{Arf}$ en (A) hígado y (B) islotes pancreáticos aislados. La cuantificación en los gráficos representa la media de 3-8 blots independientes. La proteína (100 μ g) se sometió a análisis por western blot usando anticuerpos contra las diferentes proteínas y β -actina. Se muestran imágenes representativas en la derecha de los paneles. El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

1.1.2. El locus *Ink4/Arf* disminuye la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina inducida por la deficiencia parcial de *Irs2*

El análisis del peso corporal de los tres grupos de ratones no mostró diferencias significativas (Figura 20A). De manera similar, la grasa corporal y la distribución de la grasa corporal mostraron porcentajes similares en los tres grupos de ratones (Figura 20B).

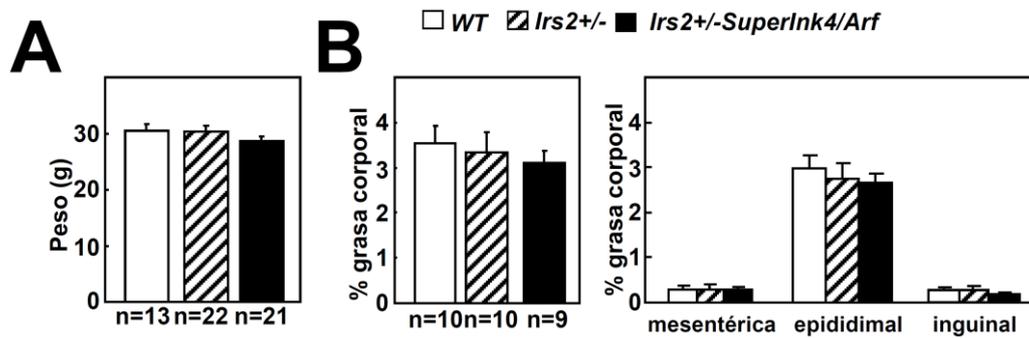


Figura 20. El aumento en la expresión del locus *Ink4/Arf* en los ratones *Irs2*^{+/-} no afecta a la distribución de la grasa corporal. (A) Peso corporal, (B) grasa corporal (panel izquierdo) y distribución de la grasa corporal (panel derecho). El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

La caracterización metabólica de los ratones mostró unos niveles similares de glucosa en ayunas entre los ratones *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf*, pero estos niveles fueron superiores en comparación con los ratones *WT* (**Figura 21A**, panel izquierdo, $p < 0.002$ y $p < 0.04$, respectivamente). Los niveles plasmáticos de insulina en ratones ayunados fueron significativamente mayores en los ratones *Irs2*^{+/-} comparado con los niveles de insulina de los ratones *WT* y de los ratones *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf* (**Figura 21A**, panel central, $p < 0.02$ para ambos). De acuerdo con estos resultados, el índice HOMA-RI también fue superior en los ratones *Irs2*^{+/-} en comparación con los índices obtenidos en los ratones *WT* e *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf* (**Figura 21A**, panel derecho, $p < 0.02$ y $p < 0.04$, respectivamente). Los niveles de insulina y el índice HOMA-RI (**Figura 21A**) fueron similares en ratones *WT* e *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf*. El análisis de la tolerancia a la glucosa, determinada por el parámetro $AUC_{glucosa}$ obtenido durante el TTG (curva glucosa vs tiempo), mostró un incremento en la intolerancia a la glucosa en los ratones *Irs2*^{+/-} (**Figura 21B**, panel superior, $p < 0.04$) en comparación con los ratones *WT*. Sin embargo, el aumento de expresión de *Ink4/Arf* en los ratones *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf* mejoró la tolerancia a la glucosa, demostrado por una reducción en el parámetro $AUC_{glucosa}$ de los ratones *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf* en comparación con los ratones *Irs2*^{+/-} (**Figura 21B**, panel superior, $p < 0.003$). El análisis de la insulina liberada durante el TTG, expresada como $AUC_{insulina}$, no mostró diferencias significativas entre los tres grupos (**Figura 21B**, panel inferior), aunque la secreción de insulina fue ligeramente mayor en los ratones *Irs2*^{+/-} durante el test en comparación con los otros grupos.

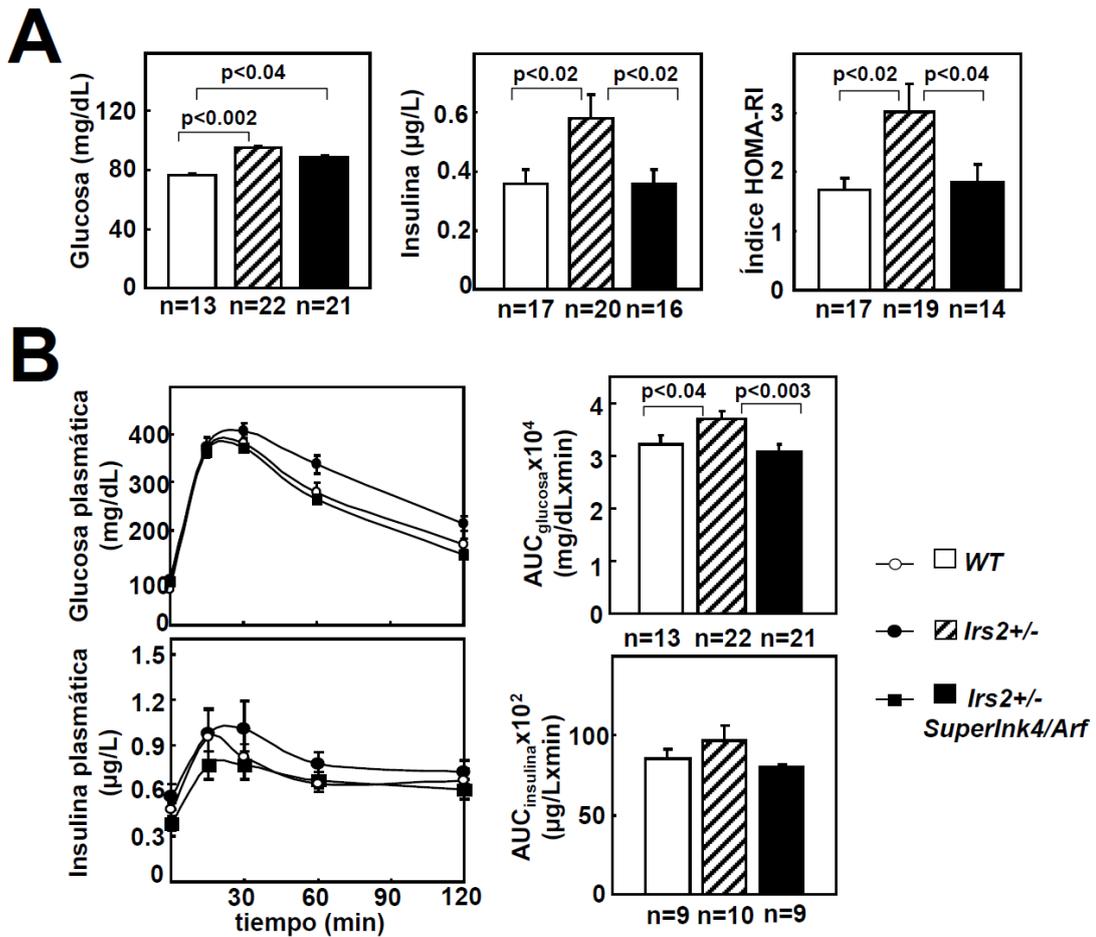


Figura 21. El aumento en la expresión del locus *Ink4/Arf* en los ratones *Irs2*^{+/-} mejora el metabolismo de la glucosa. **(A)** Niveles de glucosa plasmática en ayunas, niveles de insulina en ayunas e índice HOMA-RI en ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} y *Irs2*^{+/-} SuperInk4/Arf. **(B)** Niveles plasmáticos de glucosa (panel superior) e insulina (panel inferior) a diferentes tiempos del TIG en ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} y *Irs2*^{+/-} SuperInk4/Arf, los cuales se usaron para calcular el AUC_{glucosa} y AUC_{insulina} (paneles de la derecha). El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

El análisis de la sensibilidad a la insulina mediante el TTI mostró un incremento en el parámetro AUC_{glucosa}, indicando mayor RI en los ratones *Irs2*^{+/-} comparado con los ratones *WT* (**Figura 22**, p<0.05). La presencia de una copia extra del locus en los ratones *Irs2*^{+/-} SuperInk4/Arf produjo una disminución del parámetro AUC_{glucosa} durante el TTI, y por lo tanto una mejora en la sensibilidad a la insulina en comparación con los ratones *Irs2*^{+/-} (**Figura 22**, p<0.02). La sensibilidad a la insulina fue similar en ratones *WT* y ratones *Irs2*^{+/-} SuperInk4/Arf.

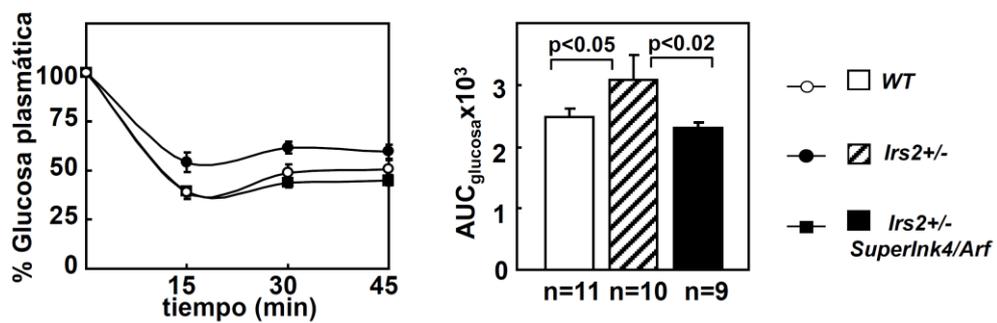


Figura 22. El aumento en la expresión del locus *Ink4/Arf* en los ratones *Irs2+/-* mejora la sensibilidad a la insulina. Niveles de glucosa (porcentaje relativo a los niveles de glucosa inicial) durante el TTI en los ratones ayunados durante 4 horas. El panel derecho muestra el AUC_{glucosa} de los tres grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

Por lo tanto, estos resultados indican que la deficiencia parcial del gen *Irs2* en ratones de un año de edad, produce intolerancia a la glucosa y RI y que un aumento en la dosis génica del locus *Ink4/Arf* disminuye dichas alteraciones metabólicas a niveles de los ratones *WT*.

1.1.3. Efecto de una dosis extra del locus *Ink4/Arf* en el páncreas de ratones *Irs2+/-*

Dado que los cambios en la homeostasis de la glucosa pueden atribuirse en parte a cambios en la funcionalidad del páncreas, seguidamente investigamos el efecto de la sobreexpresión del locus *Ink4/Arf* en el páncreas. El análisis del número de islotes pancreáticos, detectados mediante inmunohistoquímica de la insulina, no mostró diferencias entre los diferentes genotipos (**Figura 23A**, panel izquierdo). Sin embargo, el área relativa ocupada por las células β fue significativamente mayor en los ratones *Irs2+/-*, en comparación con la de los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* (**Figura 23A**, panel derecho, $p < 0.04$). Además, una disminución en el contenido de células β en los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* coincidió con una disminución en la proliferación de éstas, medida como células positivas para el marcador de proliferación Ki67, en comparación con los grupos de ratones *WT* e *Irs2+/-* (**Figura 23B**, $p = 0.05$ y $p < 0.009$ respectivamente). Estos resultados son consistentes con el papel clave del locus *Ink4/Arf* como inhibidor del ciclo celular y con su implicación en el mantenimiento de las células β , así como con un incremento de la expresión de proteínas del locus en los islotes pancreáticos. Sin embargo, estos resultados no explican la mejora en la

tolerancia a la glucosa y en la sensibilidad a la insulina en ratones *Irs2*^{+/-}-*Superlnk4*/*Arf* que poseen una dosis génica adicional del locus.

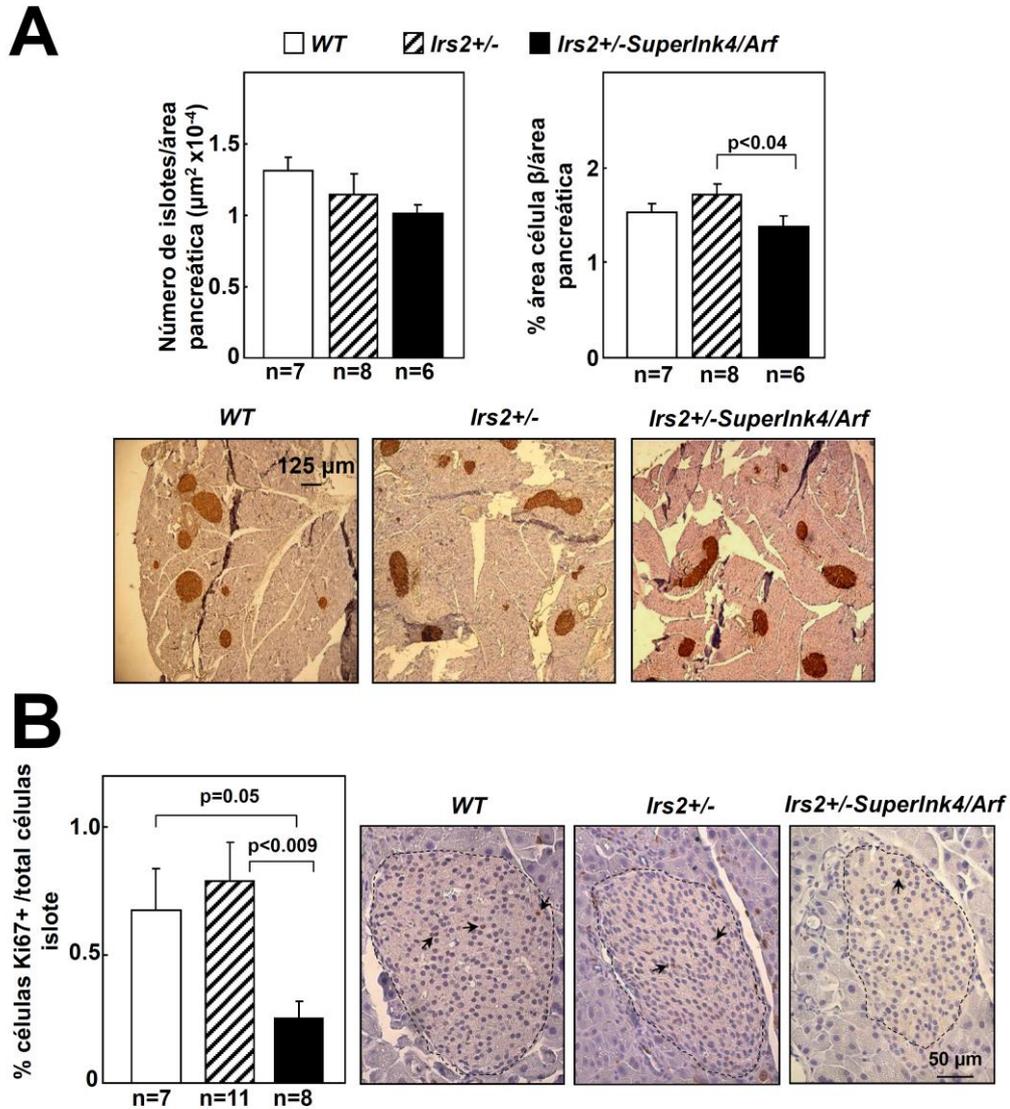


Figura 23. Caracterización de los islotes pancreáticos en los ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}-*Superlnk4*/*Arf*. (A) Número relativo de islotes y porcentaje del área ocupada por las células β identificadas por inmunohistoquímica anti-insulina. (B) Cuantificación de células proliferantes del islote determinadas como células positivas para el marcador Ki67 por inmunohistoquímica. Se muestran imágenes representativas. Los datos se presentan como media \pm error. El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

1.1.4. La sobreexpresión del locus en el ratón *Irs2*^{+/-} disminuye la esteatosis hepática y la inflamación asociada

Teniendo en cuenta que la esteatosis hepática y la inflamación pueden estar asociadas con una pérdida de la sensibilidad a la insulina (Wen et al., 2011), se analizaron los hígados de los ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} y *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*. Los ratones *Irs2*^{+/-} mostraron un aumento en el contenido de triglicéridos hepáticos en comparación con los ratones *WT* e *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf* (**Figura 24A**, $p < 0.0002$ y $p < 0.002$, respectivamente), siendo los niveles de triglicéridos similar en estos dos últimos grupos. Consistente con estos resultados, el análisis inmunohistopatológico del hígado mostró un aumento en el número de células con gotas lipídicas en su interior (**Figura 24B**, $p < 0.02$) y un incremento en el tamaño de las gotas lipídicas (**Figura 24B**, $p < 0.007$) en los ratones *Irs2*^{+/-} comparado con los ratones *WT*. Sin embargo, una copia extra del locus en los ratones *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*, redujo significativamente el número de células con gotas lipídicas (**Figura 24B**, $p < 0.02$) y el tamaño de éstas (**Figura 24B**, $p < 0.02$) en comparación con los ratones *Irs2*^{+/-}.

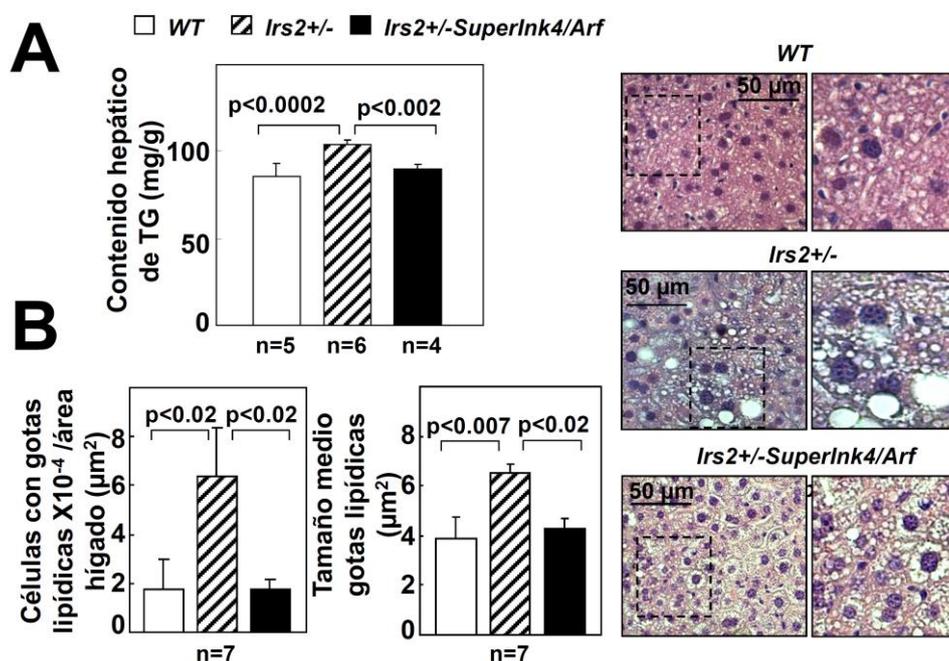


Figura 24. Caracterización del hígado en ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*. (A) Contenido hepático de TG (panel superior) y (B) contenido de gotas lipídicas (LD) expresado como número de células con LD y como el tamaño medio de LD (paneles inferiores). El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

Resultados

El análisis inmunohistoquímico del contenido de macrófagos (células de Kupffer) en el hígado identificados con el marcador F4/80 mostró un incremento en la infiltración de macrófagos en los ratones *Irs2*^{+/-} en comparación con los ratones *WT* (**Figura 25**, $p < 0.02$). El número de macrófagos en el hígado de los ratones *Irs2*^{+/-} *SuperInk4/Arf* fue similar a los ratones *WT* y significativamente menor en comparación con el número de macrófagos en los ratones *Irs2*^{+/-} (**Figura 25**, $p < 0.04$).

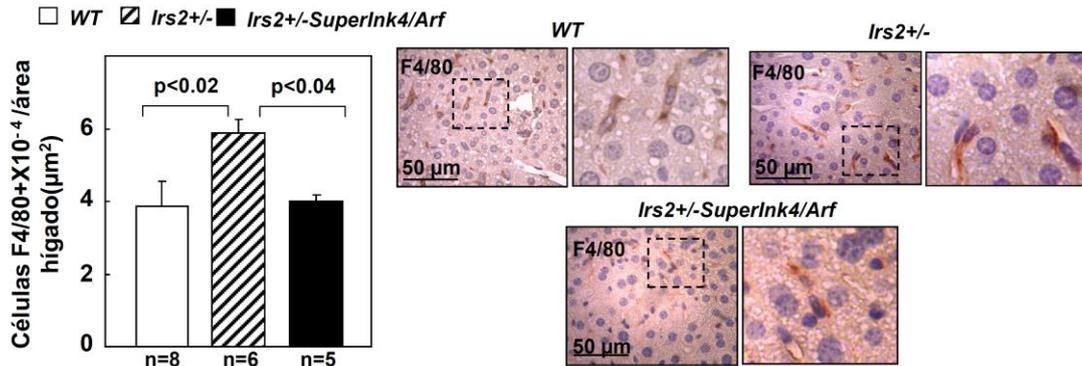


Figura 25. Caracterización del hígado en los ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-} *SuperInk4/Arf*. Contenido en macrófagos (Células positivas para F4/80 relativo al área hepática) en secciones hepáticas de ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-} *SuperInk4/Arf*. Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica. El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

Consistente con los resultados anteriores, los niveles de ARNm hepático de los mediadores proinflamatorios *Mcp1* y *Tnfa* fueron superiores en los ratones *Irs2*^{+/-} comparado con los niveles de expresión hepática en los ratones *WT* e *Irs2*^{+/-} *SuperInk4/Arf* (**Figura 26**, $p < 0.001$ y $p < 0.003$ vs *WT*; $p < 0.02$ y $p < 0.002$ vs *Irs2*^{+/-} *SuperInk4/Arf*) indicando mayor estado inflamatorio en el hígado de los ratones *Irs2*^{+/-}.

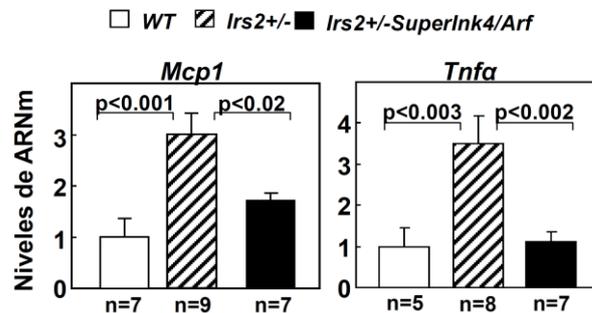


Figura 26. Caracterización del hígado en los ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-} *SuperInk4/Arf*. Niveles de ARNm en hígado de *Mcp1* y *Tnfa* normalizados con los niveles del gen endógeno *ciclofilina* y relativizados a los niveles de ARNm del ratón. El análisis estadístico se realizó mediante el test One-way ANOVA.

Estos resultados demuestran que en los ratones *Irs2*^{+/-}, la RI y el desajuste del metabolismo de carbohidratos está acompañado por un aumento en la inflamación hepática y en la esteatosis hepática y que un aumento en la dosis génica, que produce aumento de expresión del locus *Ink4/Arf*, previene el desarrollo de estas alteraciones metabólicas y de la esteatosis hepática.

1.2. Estudio del efecto de la sobreexpresión del locus *Ink4/Arf* en la inflamación asociada

1.2.1. La reducción de la inflamación sistémica en el ratón *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf*

Para profundizar en la inflamación asociada a la esteatosis hepática observada anteriormente se realizó un análisis detallado de la inflamación sistémica. Como se observa en la **Figura 27**, los niveles plasmáticos de las citoquinas proinflamatorias MCP1 y TNF α en los ratones *Irs2*^{+/-} fueron mayores en comparación con los ratones *WT* (**Figura 27A**, $p < 0.05$ y $p < 0.03$, respectivamente). Consistente con los resultados anteriores, los niveles de estas citoquinas estuvieron significativamente reducidos en los ratones *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf* (**Figura 27A**, $p < 0.005$ y $p < 0.01$). De manera similar, el análisis de los leucocitos circulantes mostró una monocitosis en los ratones *Irs2*^{+/-} comparado con los otros dos grupos de ratones *WT* (**Figura 27B**, $p < 0.0005$) e *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf* (**Figura 27B**, $p < 0.03$). Un análisis adicional de las subpoblaciones de monocitos mostró un aumento en el porcentaje de la subpoblación de monocitos proinflamatorios proinvasivos Ly6C^{hi} en los ratones *Irs2*^{+/-} comparado con los ratones *WT* y los ratones *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf* (**Figura 27C**, panel izquierdo $p < 0.007$ y $p < 0.03$, respectivamente). El porcentaje de la población de monocitos vigilantes o patrulladores, Ly6C^{low}, fue significativamente menor en los ratones *Irs2*^{+/-} en comparación con el de los ratones *WT* y *Irs2*^{+/-}-*SuperInk4/Arf* (**Figura 27C**, panel derecho, $p < 0.003$ y $p = 0.05$, respectivamente).

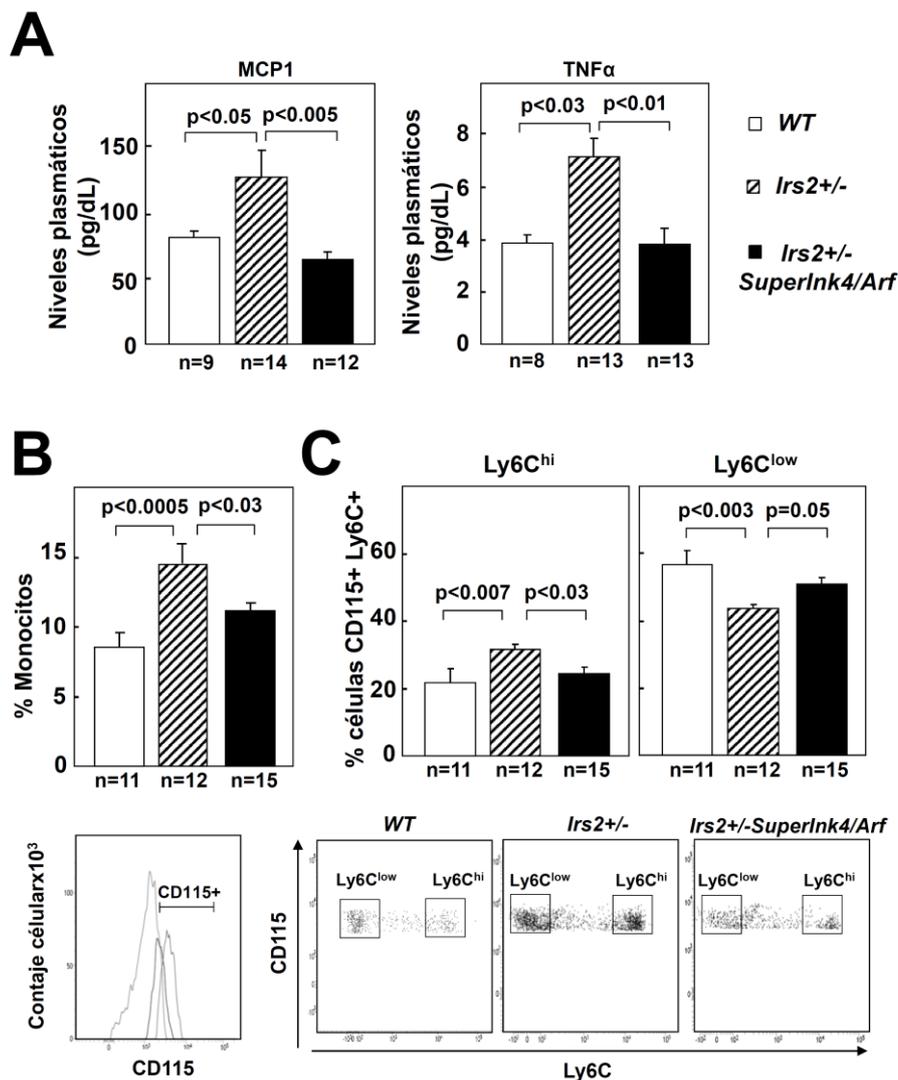


Figura 27. Inflamación sistémica en los ratones WT, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*. (A) Niveles plasmáticos de MCP1 y TNFα en ratones WT, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*. (B) Porcentaje de monocitos circulantes identificados como células positivas para los marcadores CD45 y CD115. (C) Porcentaje de células Ly6C^{hi} y Ly6C^{low} en monocitos CD45+CD115+ en ratones WT, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*. Se muestran plots representativos del análisis de la citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó mediante el test One-way ANOVA.

La caracterización de los linfocitos T mostró una disminución en el número total de células CD3 positivas (**Figura 28A**, $p < 0.004$ y $p = 0.05$) en los ratones *Irs2*^{+/-} y no vió ninguna diferencia en la activación de estas células (células doblemente positivas para CD3+CD69+). Sin embargo, la caracterización más detallada de los subtipos de células T mostró que, siguiendo con lo observado anteriormente, el porcentaje de los subtipos de linfocitos T activados, células CD4+CD69+ y CD8+CD69+, fue significativamente mayor en los ratones *Irs2*^{+/-} en comparación con los ratones WT

(Figura 28B, $p < 0.01$ y $p < 0.0003$). Los ratones *Irs2*^{+/-}*SuperInk4/Arf* presentaron, por el contrario, una disminución significativa de células CD4+CD69+ y CD8+CD69+ comparado con los ratones *Irs2*^{+/-} (Figura 28B, $p < 0.03$ y $p < 0.05$, respectivamente). Estos resultados indican que la haploinsuficiencia del gen *Irs2* en los ratones induce un fenotipo proinflamatorio sistémico consistente en un aumento en la activación de células inflamatorias y de mediadores que están reducidos en el ratón que presenta una copia adicional del locus *Ink4/Arf*.

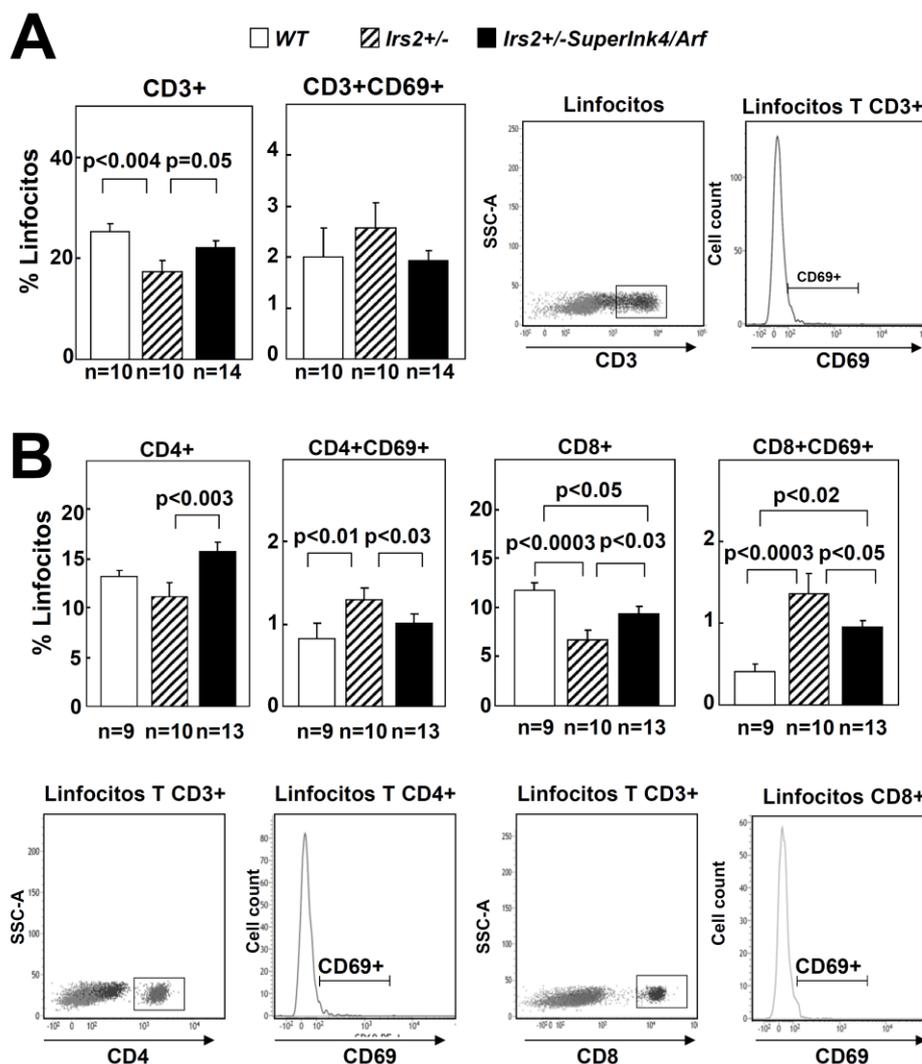


Figura 28. Caracterización de los linfocitos T circulantes en ratones WT, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*SuperInk4/Arf*. (A) Linfocitos T circulantes totales y activados identificados como células CD3+ y CD3+CD69+ respectivamente. (B) Cuantificación de las células CD4+ y CD8+ y sus formas activadas CD4+CD69+ y CD8+ CD69+. Se muestran plots representativos del análisis de la citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

1.2.2. Caracterización de macrófagos procedentes de los ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*

Para profundizar en los cambios inflamatorios observados se caracterizaron macrófagos procedentes de los tres grupos de ratones. El análisis de MDMO aislados de los ratones, mostró un aumento en los niveles de ARNm de las citoquinas *Mcp1*, *Tnfa* e *Il6* en los macrófagos *Irs2*^{+/-} en comparación con los de los macrófagos *WT* (**Figura 29A**, $p < 0.05$, $p < 0.008$ y $p < 0.004$, respectivamente) y de los macrófagos *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf* (**Figura 29A**, $p < 0.02$, $p < 0.03$ y $p < 0.01$, respectivamente). El análisis de expresión de los genes del locus mostraron un aumento en la expresión de los niveles de ARNm de *p15^{Ink4b}* y *p19^{Arf}* en los macrófagos de los ratones *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf* comparado con los niveles de ARNm de los ratones *Irs2*^{+/-} y *WT* (**Figura 29B**, $p = 0.05$ y $p < 0.02$ vs ratones *WT*; $p < 0.006$ y $p < 0.007$ vs ratones *Irs2*^{+/-}). Además, los niveles de ARNm de *p16^{Ink4a}* (**Figura 29B**, panel central) fueron más bajos en los macrófagos *Irs2*^{+/-} ($p < 0.03$ vs *WT* y $p < 0.04$ vs *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*).

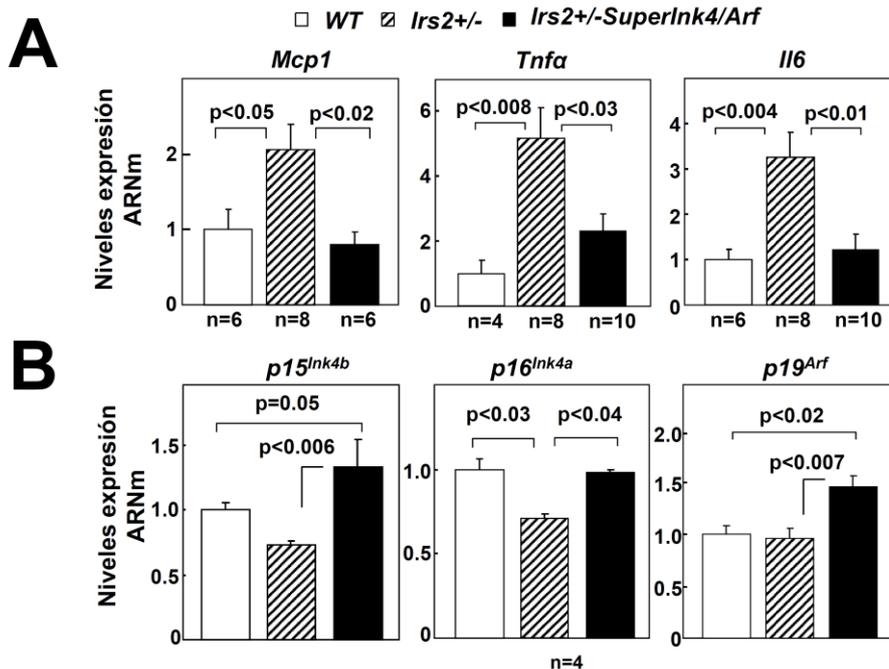


Figura 29. Caracterización de los macrófagos procedentes de los ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*. (A) Niveles de expresión de ARNm de *Mcp1*, *Tnfa* e *Il6* en ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*. (B) Niveles de expresión de ARNm de *p15^{Ink4b}*, *p16^{Ink4a}* y *p19^{Arf}* en los macrófagos de ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} y *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*. Los niveles de expresión se normalizaron con los niveles del gen endógeno *ciclofilina* y relativizados a la expresión del ARNm de los ratones *WT*. El análisis se realizó mediante el test One-way ANOVA.

El análisis funcional de estas células mostró además que la disminución del fenotipo inflamatorio en los macrófagos *Irs2+/-Superlnk4/Arf* se asoció con un incremento en la actividad del locus *Ink4/Arf*, medido como una disminución de la proliferación (**Figura 30A**, $p < 0.0008$ vs *Irs2+/-* y $p < 0.03$ vs *WT*), y un incremento en la apoptosis inducida por luz UV (**Figura 30B**, $p < 0.05$ vs *Irs2+/-* y $p < 0.0003$ vs *WT*).

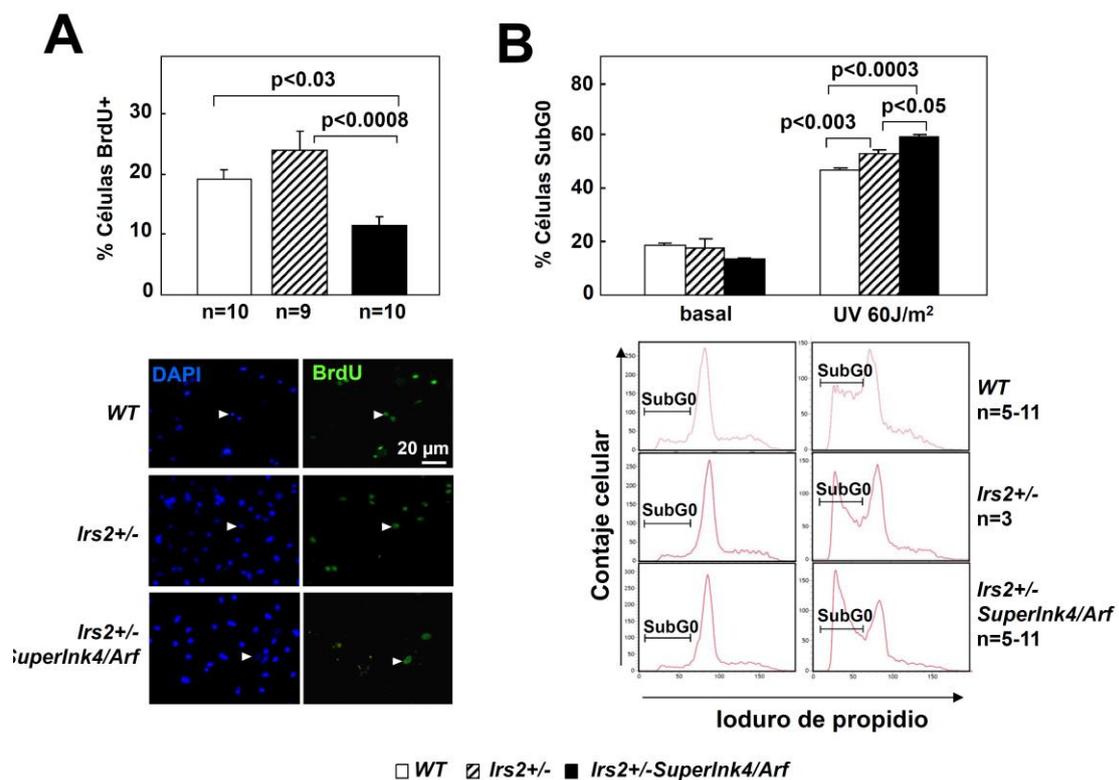


Figura 30. Caracterización funcional de los macrófagos procedentes de los ratones *WT*, *Irs2+/-* e *Irs2+/-Superlnk4/Arf*. (A) Porcentaje de macrófagos proliferantes analizados mediante la incorporación de BrdU y detectados por inmunofluorescencia. Las flechas blancas señalan las células BrdU+. (B) Análisis de la apoptosis en los macrófagos de los ratones *WT*, *Irs2+/-* e *Irs2+/-Superlnk4/Arf* expresada como porcentaje de células SubG0 en el análisis del ciclo celular. Se muestran imágenes y plots representativos. El análisis se realizó mediante los tests One-way ANOVA (A) y Two-way ANOVA (B).

Estos estudios indican que los macrófagos procedentes de los ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf* muestran una disminución del fenotipo inflamatorio y esto se relaciona con un aumento en la expresión y en la funcionalidad del transgen.

1.2.3. La administración de TNF α *in vivo* en el ratón *Irs2+/-Superlnk4/Arf* disminuye la señalización canónica de la insulina mediada por IRS/AKT y aumenta la vía de estrés SAPK/JKN

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que una mejora en la homeostasis de la glucosa inducida por un incremento de la dosis del locus *Ink4/Arf* se asocia a un aumento de la vía canónica de señalización de la insulina (Gonzalez-Navarro et al., 2013). Por ello se analizó la señalización de la insulina mediada por la vía IRS/AKT mediante estudios de señalización de la insulina *in vivo*. El análisis *in vivo* de la señalización de la insulina mostró una disminución de los niveles de la forma activada por insulina de IRS1, fosfotirosina-(pTyr)IRS1, en el hígado de los ratones *Irs2+/-* en comparación con los ratones *WT* (**Figura 31A**, $p=0.05$). Coincidiendo con una mejora en la sensibilidad a la insulina y en la homeostasis de la glucosa, los ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf* mostraron un aumento en los niveles de la proteína pTyrIRS1 en comparación con los niveles de proteína en los ratones *Irs2+/-* (**Figura 31A**, $p<0.005$). Los niveles de pTyrIRS1 fueron similares en los ratones *WT* y *Irs2+/-Superlnk4/Arf*. No se observaron cambios en los niveles proteínicos de IRS1 total ni en los niveles de expresión del ARNm entre los diferentes grupos de ratones (**Figura 31B**). El análisis de los niveles de la forma activa del mediador intracelular AKT1/2, pAKT1/2, en el hígado mostró niveles reducidos en los ratones *Irs2+/-* comparado con los ratones *WT* (**Figura 31C**, panel superior, $p<0.02$). Consistente con una mejora en la señalización de la insulina, los niveles de la proteína pAKT1/2 en el hígado de los ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf* fueron significativamente superiores a los niveles de los ratones *Irs2+/-* (**Figura 31C**, panel superior, $p<0.006$) y similares a los niveles de pAKT1/2 en los ratones *WT*.

De manera similar, los niveles de la proteína pAKT1/2 fueron inferiores en el músculo esquelético de los ratones *Irs2+/-* comparado con los niveles observados en el músculo esquelético de los otros dos grupos de ratones *WT* y *Superlnk4/Arf* (**Figura 31C**, panel inferior, $p=0.05$ y $p<0.002$, respectivamente). Estos resultados demuestran que la mejora en la homeostasis de la glucosa, la reducción de la esteatosis hepática y la disminución en la inflamación en los ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf* están acompañadas de una mejora en la vía de señalización de la insulina mediada por IRS1/AKT1/2 en comparación con los ratones *Irs2+/-*, y que una dosis extra del locus en ratones *Irs2+/-* induce un fenotipo similar al observado en los ratones *WT*.

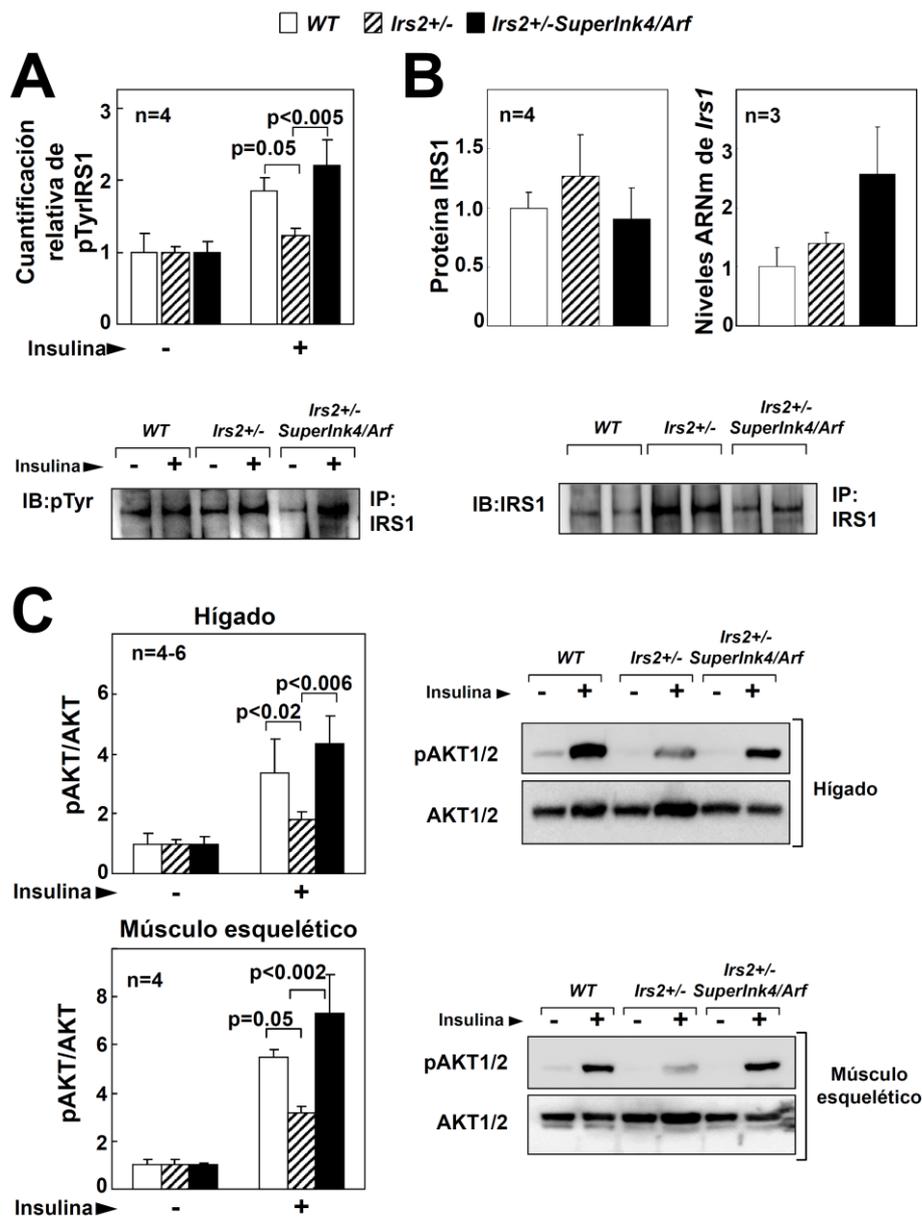


Figura 31. Señalización de la insulina en los ratones *WT*, *Irs2*^{+/-} e *Irs2*^{+/-}-*Superlnk4/Arf*. (A) Análisis de los niveles de proteína pTyrIRS1 en lisados hepáticos sometidos a inmunoprecipitación con anti-IRS1. Los niveles de proteína pTyr se muestran relativizados a la muestra no estimulada del ratón del mismo genotipo. (B) Niveles totales de la proteína IRS1 analizada por western blot inmunoprecipitada con el mismo anticuerpo. Los niveles de proteína se relativizaron a los del ratón *WT* (panel izquierdo). Los niveles de expresión de ARNm de *Irs1* (panel derecho) se normalizaron con los niveles del gen endógeno *ciclofilina* y fueron relativizados a los niveles de ARNm del ratón *WT*. (C) Niveles de la proteína pAKT1/2 (pAKT1/2) y AKT1/2 en el hígado y músculo esquelético. Las formas fosforiladas se normalizaron a los niveles de proteína total (ratio pAKT/AKT). Los niveles de expresión pAKT/AKT fueron relativizados a los niveles de expresión pAKT/AKT de las muestras del mismo genotipo no estimulada. Se muestran blots representativos. El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

Dadas las diferencias observadas en la inflamación, y que los niveles de las citoquinas pueden dañar la señalización y la sensibilidad de la insulina activando la vía

Resultados

de estrés SAPK/JNK, y la subsiguiente inactivación de IRS1 mediante fosforilación de la Serina-307 (pSer307IRS1) (Tanti and Jager, 2009), se investigó si la estimulación con TNF α podría modular la señalización en los ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf*. El análisis de la vía de estrés pSer307IRS1/SAPK/JNK tras estimulación con insulina reveló una disminución en los niveles de la forma inactiva de la proteína pSer307IRS1 (**Figura 32A**, panel superior, $p=0.05$) y de la proteína pSAPK/JNK (**Figura 32A**, panel inferior, $p<0.04$) en el hígado de los ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf* en comparación con los de los ratones *Irs2+/-*. Sin embargo, la infusión *in vivo* de TNF α seguido de estimulación con insulina en ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf* incrementó los niveles de las proteínas pSer307IRS1 y pSAPK/JNK en el hígado, siendo éstos comparables con los observados en el hígado de los ratones *Irs2+/-* (**Figura 32A**). Consistente con los resultados anteriores, los niveles de la proteína pAKT tras estimulación con insulina, fue mayor en los ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf* comparado con los ratones *Irs2+/-* (**Figura 32B**, $p<0.02$) pero, tras la infusión *in vivo* de TNF α , los niveles de pAKT1/2 fueron similares en los dos grupos de ratones (**Figura 32B**). Todos estos resultados indican que la mejora en la señalización de la insulina, en la inflamación y en la homeostasis de la glucosa en los ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf* están asociados con una menor actividad de la vía de estrés SAPK/JNK y con un aumento en la vía canónica de señalización de la insulina IRS1/AKT.

Dado que el tratamiento con la citoquina TNF α suprime la mejora de la señalización de la insulina en los ratones *Irs2+/-Superlnk4/Arf* y que un incremento del locus está asociado con una reducción en el fenotipo proinflamatorio de los macrófagos, es posible que, mediante la reducción de la inflamación y de los niveles de la citoquinas circulantes, el locus *Ink4/Arf* revierta la señalización de la insulina y la homeostasis de la glucosa.

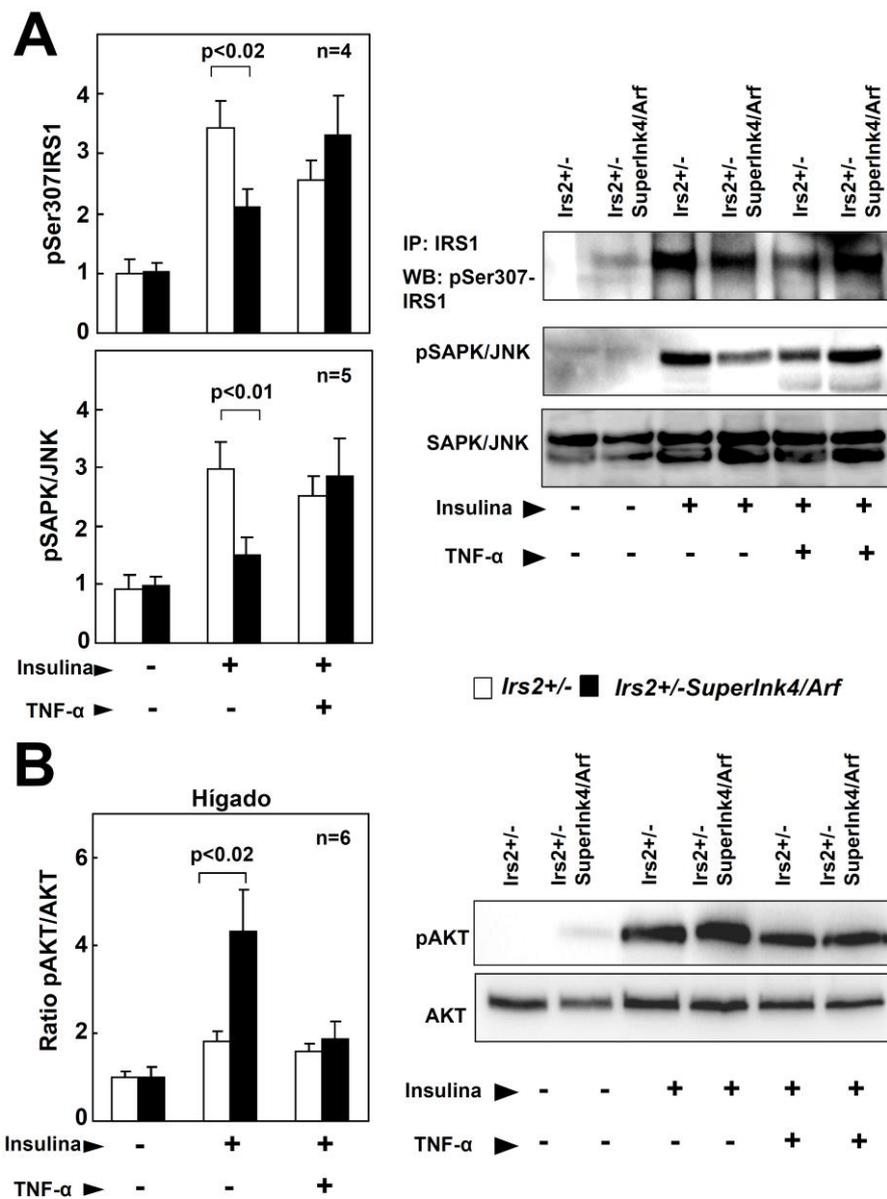


Figura 32. Efecto de TNF α sobre la señalización de la insulina en el ratón *Irs2*^{+/-}*Superlnk4/Arf*. (A) Cuantificación de los niveles de proteína de pSer307IRS1 (panel superior) y pSAPK/JNK (panel inferior) en el hígado de ratones tratados con TNF α y sin tratar, y estimulados con insulina o no. (B) Niveles de proteína de pAKT1/2 y AKT1/2 en hígado de ratones tratados o no con TNF α y estimulados o no con insulina. Las formas fosforiladas se normalizaron a los niveles de proteína total (ratio pAKT/AKT). Los niveles de expresión pAKT/AKT fueron relativizados a los niveles de expresión pAKT/AKT de las muestras del mismo genotipo no estimuladas. Los niveles de pSer307IRS1 se relativizaron a los niveles de las muestras sin estimular. A la derecha de las cuantificaciones se muestran blots representativos. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

1.3. Estudios del papel del locus *Ink4/Arf* en el desarrollo de resistencia a la insulina y en la inflamación asociada en pacientes con DMT2 y con CAD

1.3.1. Caracterización cardiometabólica de los controles y pacientes con DMT2 y DMT2-CAD

Las características demográficas y clínicas de los pacientes se resumen en la **Tabla 14**. La distribución del género y edad fue diferente entre los diferentes grupos pero la significancia estadística de los parámetros analizados se mantuvo después de la corrección por género y edad. En comparación con los controles, los pacientes con DMT2 y DMT2-CAD mostraron un mayor índice de masa corporal, circunferencia de la cintura y triglicéridos. Por el contrario, los pacientes DMT2 y DMT2-CAD mostraron niveles más bajos de colesterol-HDL. No se encontraron cambios en los niveles de proteína C reactiva.

Como es esperable, la insulina medida, la glucosa y el índice HOMA-RI fueron mayores en pacientes DMT2 y DMT2-CAD comparado con los controles. Además los sujetos con DMT2 y DMT2-CAD mostraron una mayor prevalencia de obesidad, dislipidemia e hipertensión en comparación con los sujetos control. Los pacientes con DMT2 y DMT2-CAD tuvieron una mayor frecuencia de terapias hipoglucemiantes orales e hipolipemiantes y de antihipertensivos y la frecuencia de estas terapias coincidió con la prevalencia de dichas alteraciones metabólicas. Consistente con una mayor prevalencia de alteraciones metabólicas, el examen de la arteria carótida humana por ultrasonido reveló un aumento del GIM-CC en sujetos con DMT2 y con DMT2-CAD en comparación con los controles sanos. Además, los sujetos con DMT2-CAD mostraron mayor circunferencia de cintura, glucosa en ayunas y GIM-CC que en los sujetos con DMT2.

Tabla 14. Características clínicas y demográficas de los sujetos control y pacientes con DMT2 y con DMT2-CAD

	Controles	DMT2	DMT2-CAD
Género (Hombre/Mujer)	75(48/27)	54(24/30)*	35(8/27)**
Edad (años)	36.2 ± 13.4	55.1 ± 11.7*	64.9 ± 8.6**
Presión arterial Sistólica (mmHg)	117.4 ± 12.2	127.6 ± 15.1	140.2 ± 21.1*
Presión arterial diastólica (mmHg)	72.7 ± 8.4	79 ± 11.5	76.5 ± 9.3
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	23.5 ± 3.6	29.0 ± 4.9*	32.3 ± 4.5*
Medida circunferencia (cm)	80.5 ± 12.0	94.0 ± 8.9*	113.3 ± 14.2**
Glucosa (mg/dL)	86.5 ± 10.4	130.4 ± 43.1*	156.5 ± 51.4**
Insulina (mU/L)	7.5 ± 3.2	15.2 ± 10.8*	16.3 ± 10.3*
Índice HOMA	1.6 ± 0.8	4.8 ± 3.4*	6.2 ± 4.5*
Colesterol total (mg/dL)	180.7 ± 38.8	184.3 ± 51.0	166.7 ± 36.8
Triglicéridos (mg/dL)	79.8 ± 35.9	137.7 ± 77.0*	167.8 ± 115.9*
Colesterol HDL (mg/dL)	61.6 ± 14.0	49.9 ± 13.1*	45.1 ± 10.7*
Colesterol LDL (mg/dL)	115.0 ± 28.7	108.1 ± 41.7	102.2 ± 29.5
Apo B (mg/dL)	84.6 ± 22.9	93.7 ± 26.9	88.2 ± 24.2
Proteína C-reactiva (mg/dL)	3.1 ± 5.7	4.7 ± 4.2	3.3 ± 3.0
GIM-CC (mm)	0.458 ± 0.217	0.594 ± 0.128*	0.829 ± 0.146**
Obesidad (%)	2.4	35.3	61.1
Dislipidemia (%)	4	35.4	100
Hipertensión (%)	0	29.2	71.4

*p<0.05 comparado con grupo control; **p<0.05 comparado con grupo DMT2. La significancia estadística se matuvo después de la corrección por edad y género.

1.3.2. La expresión de los genes *Cdkn2a*, *Cdkn2b* y *Cdkn2bas* disminuye en los sujetos humanos con DMT2 y DMT2-CAD

El análisis de expresión en CMSPs procedente de los tres grupos de pacientes demostró niveles significativamente menores de ARNm de *Cdkn2a* (*variante 1*, *p16^{Ink4a}*) *Cdkn2b* y *Cdkn2bas* en individuos con DMT2 y DMT2-CAD comparado con los niveles en los sujetos control (**Figura 33A**, *Cdkn2a variante 1*, *p16^{Ink4a}* p<0.03 y p<0.0007; *Cdkn2b* p<0.01 y p<0.005; *Cdkn2bas* p<0.03 y p<0.004, respectivamente). No se observaron cambios en la expresión de *Cdkn2a* (*variante 4*, *p14^{Arf}*) (**Figura 33A**). El análisis de expresión de las proteínas en CMSPs mostró una disminución en los niveles de las proteína *p16^{Ink4a}* (*Cdkn2a* variante 1) y *p15^{Inkb}* (*Cdkn2b*) en DMT2 y DMT2-CAD en comparación con los niveles observados en los controles (**Figura 33B**, *p16^{Ink4a}* p<0.03 y p<0.02; *p15^{Ink4b}* p<0.05 y p<0.01, respectivamente).

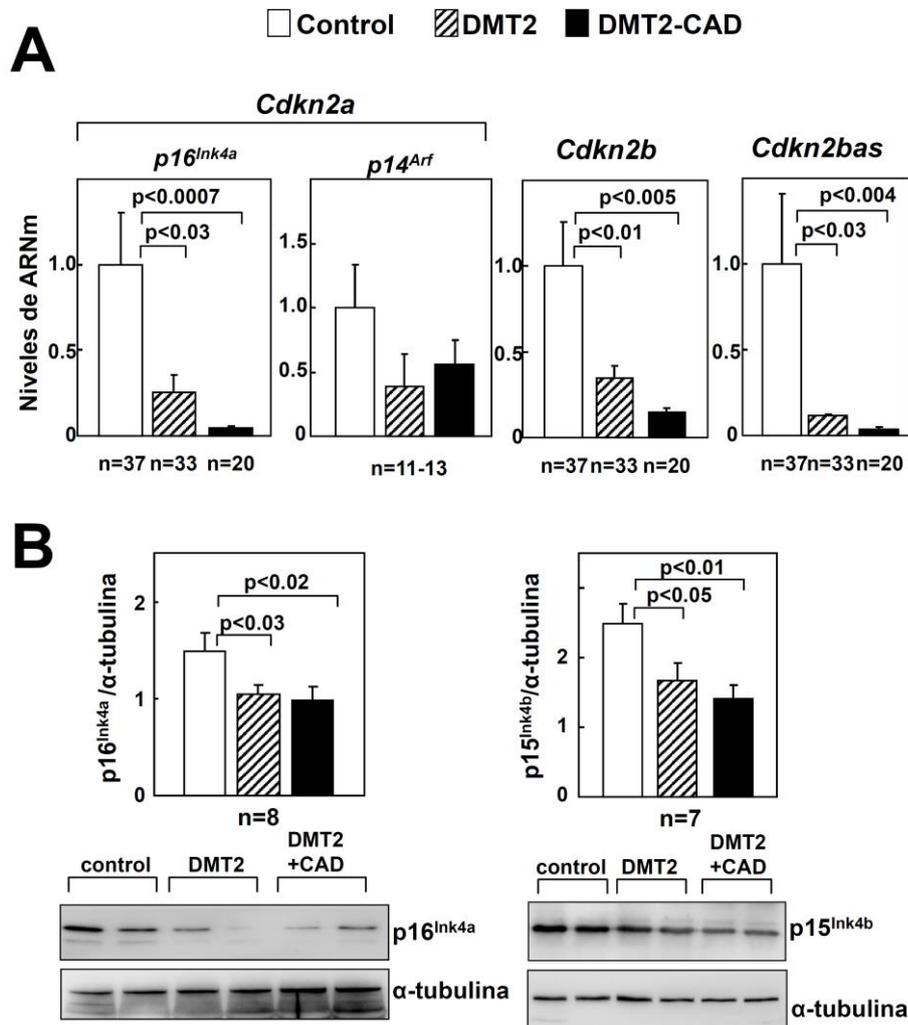


Figura 33. Análisis de expresión de los genes *Cdkn2a* (variante 1, *p16^{Ink4a}* y variante 4, *p14^{Arf}*) *Cdkn2b* y *Cdkn2bas* en CMSPs de sujetos control, DMT2 y DMT2-CAD. (A) Niveles de expresión del ARNm de *Cdkn2a* (variante 1, *p16^{Ink4a}* y variante 4, *p14^{Arf}*) *Cdkn2b* y *Cdkn2bas* de los tres grupos de sujetos. Los niveles de ARNm se normalizaron con los niveles de expresión del gen endógeno *gapdh* y relativizados a los niveles de ARNm de los pacientes control. (B) Expresión de las proteínas *p16^{Ink4a}* y *p15^{Ink4b}* en CMSPs de los controles, DMT2 y DMT2-CAD. Los niveles de proteína se normalizaron con los niveles de la proteína endógena α -tubulina para cada muestra. Se muestran blots representativos. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student y un test One-way ANOVA.

Estudios de correlación con todos los sujetos demostraron una correlación inversa entre los niveles de ARNm de *Cdkn2b* tanto con el índice HOMA-RI (Figura 34A, $p < 0.04$) como con el GIM-CC (Figura 34B, $p < 0.003$). No se observaron correlaciones significativas entre los niveles de ARNm de *Cdkn2a* (*p16^{Ink4a}*) ni *Cdkn2bas* con los parámetros índice HOMA-RI y GIM-CC.

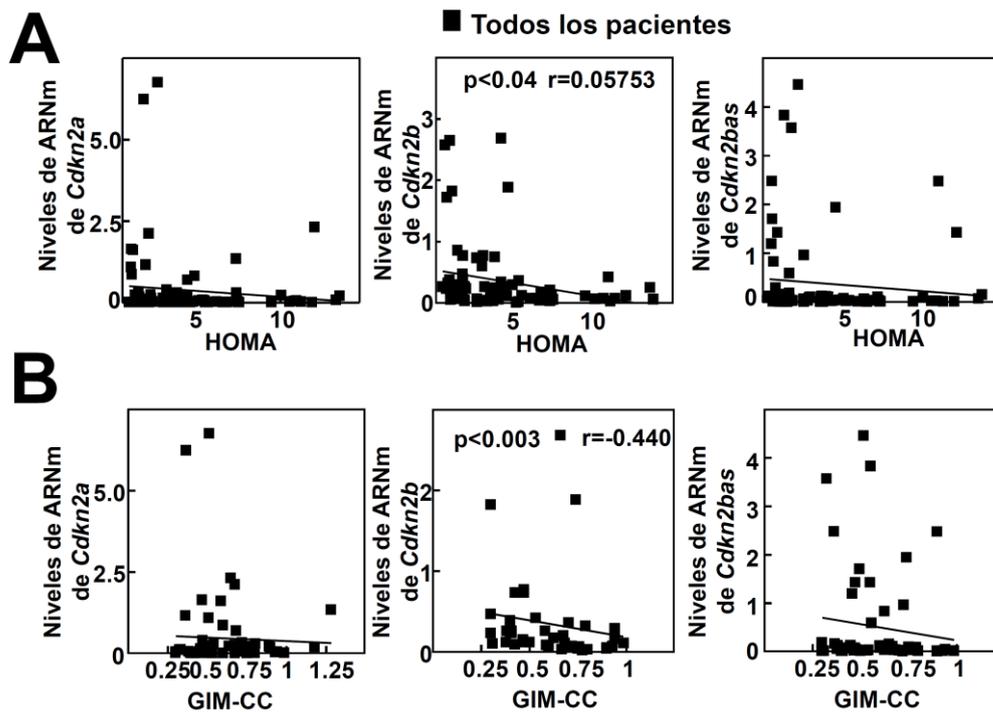


Figura 34. Estudios de correlación en sujetos control, DMT2 y DMT2-CAD. Correlación entre los niveles de expresión de ARNm de *Cdkn2a* ($p16^{Ink4a}$), *Cdkn2b* y *Cdkn2bas* (A) índice HOMA-RI y (B) GIM-CC. Los niveles de ARNm se normalizaron con los niveles del gen endógeno *gapdh* y se relativizaron a los niveles del ARNm control. El análisis estadístico se realizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Dado que $p16^{Ink4a}$ y $p15^{Ink4b}$ son potentes inhibidores del ciclo celular, se realizó el análisis del ciclo celular en CMSP de una selección de pacientes (Figura 35). El análisis por citometría de flujo de las tres fases del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio no mostró diferencias entre los controles y todos los sujetos con DMT2 (DMT2 y DMT2-CAD).

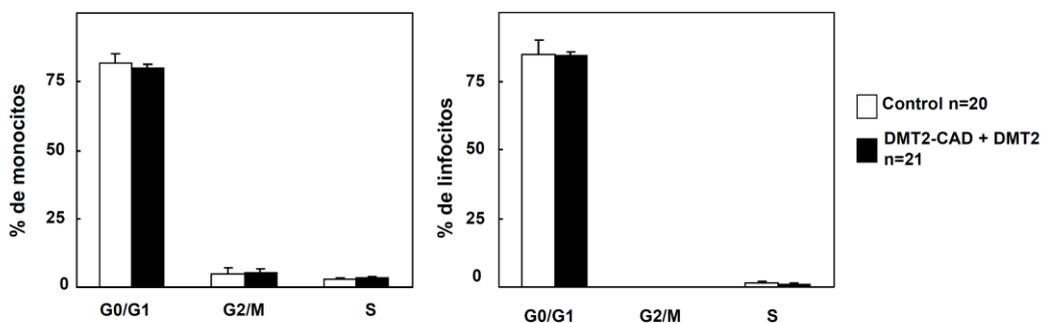


Figura 35. Análisis del ciclo celular de CMSPs. Distintas fases del ciclo G0/G1, G2/M y S en monocitos y linfocitos de sangre periférica en sujetos control y pacientes DMT2+DMT2-CAD. Para el análisis estadístico se realizó un test One-way ANOVA.

Resultados

Estos estudios demuestran una reducción en la expresión de los genes codificados por el locus *Ink4/Arf* en CMSP humanas procedentes de pacientes DMT2 y DMT2-CAD sin afectar al ciclo celular de estas células.

1.3.3. Análisis del fenotipo de los leucocitos en los sujetos con DMT2 y DMT2-CAD

El análisis por citometría de flujo no reveló diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos, monocitos o neutrófilos entre los tres grupos (**Figura 36**).

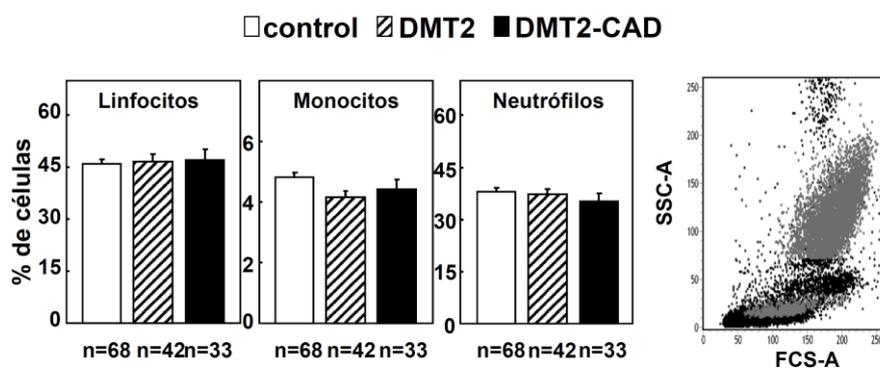


Figura 36. Caracterización de los leucocitos circulantes en los sujetos control, DMT2 y DMT2-CAD. Porcentajes de linfocitos, monocitos y neutrófilos circulantes en sangre periférica en los tres grupos de sujetos. Se muestra plot representativo del análisis por citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó mediante el test One-way ANOVA.

El análisis de linfocitos T circulantes (CD3+) mostró niveles disminuidos en sujetos DMT2 y DMT2-CAD en comparación con los individuos control (**Figura 37A**, panel izquierdo, $p < 0.004$ y $p < 0.0004$, respectivamente). Los linfocitos T activados (CD3+CD69+) mostraron porcentajes significativamente mayores en pacientes DMT2 y DMT2-CAD comparado con los porcentajes observados en los controles (**Figura 37A**, panel derecho, $p < 0.02$ y $p < 0.03$, respectivamente). No se observaron diferencias en la población de células T CD4+ entre grupos, pero el porcentaje de células T reguladoras (CD4+CD25+CD127-) fue significativamente menor en ambos grupos de pacientes (DMT2 y DMT2-CAD) (**Figura 37B**, panel derecho, $p < 0.04$ y $p < 0.003$, respectivamente).

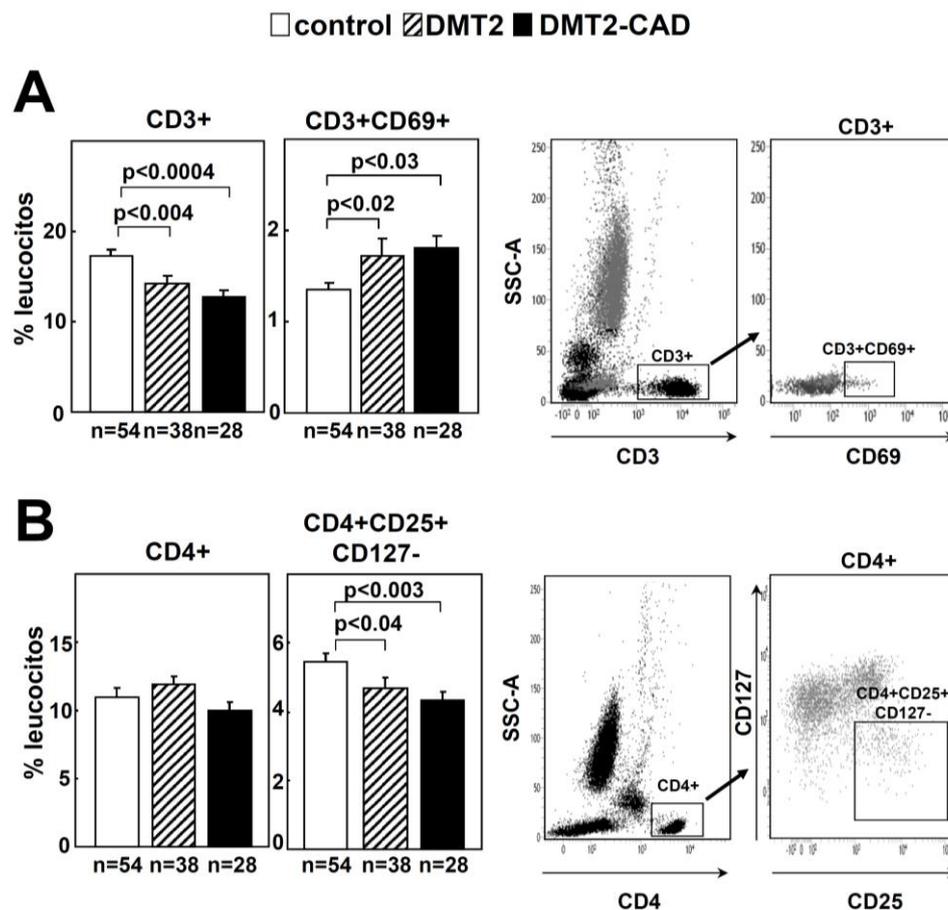


Figura 37. Caracterización de los leucocitos circulantes en los individuos control, DMT2 y DMT2-CAD. (A) Linfocitos T circulantes totales y activados identificados como células CD3+ y CD3+CD69+ respectivamente. **(B)** Porcentaje de la subpoblación de linfocitos T circulantes CD4+ y Tregs, identificadas como CD4+CD25+CD127- relativizado al total de leucocitos. Se muestran plots representativos del análisis de linfocitos T CD3+ y CD3+CD69+ y de linfocitos T CD4+ y CD4+CD25+CD127-. El análisis estadístico se realizó mediante el test One-way ANOVA.

Estudios previos indican un papel fundamental de las células Treg en el fenotipo de los monocitos (Foks et al., 2015) por lo que se caracterizaron las poblaciones de monocitos circulantes. El análisis por citometría de flujo con los marcadores CD14 y CD16, que permite diferenciar entre monocitos clásicos CD14⁺⁺CD16⁻ e intermedios CD14⁺⁺CD16⁺, ambos inflamatorios, y monocitos alternativamente activados, antiinflamatorios, CD14⁺CD16⁺⁺ (Ziegler-Heitbrock et al., 2010) mostró un incremento significativo en el porcentaje de la subpoblación de monocitos intermedios inflamatorios CD14⁺⁺CD16⁺ en pacientes DMT2 y DMT2-CAD (**Figura 38** panel central, $p < 0.004$ y $p < 0.0007$, respectivamente) en comparación con los sujetos control. No se observaron diferencias significativas en la población clásica de monocitos

Resultados

CD14⁺⁺CD16⁻ ni en la subpoblación de monocitos CD14⁺CD16⁺⁺, aunque la no clásica fue modestamente menor en DMT2 y DMT2-CAD (**Figura 38**).

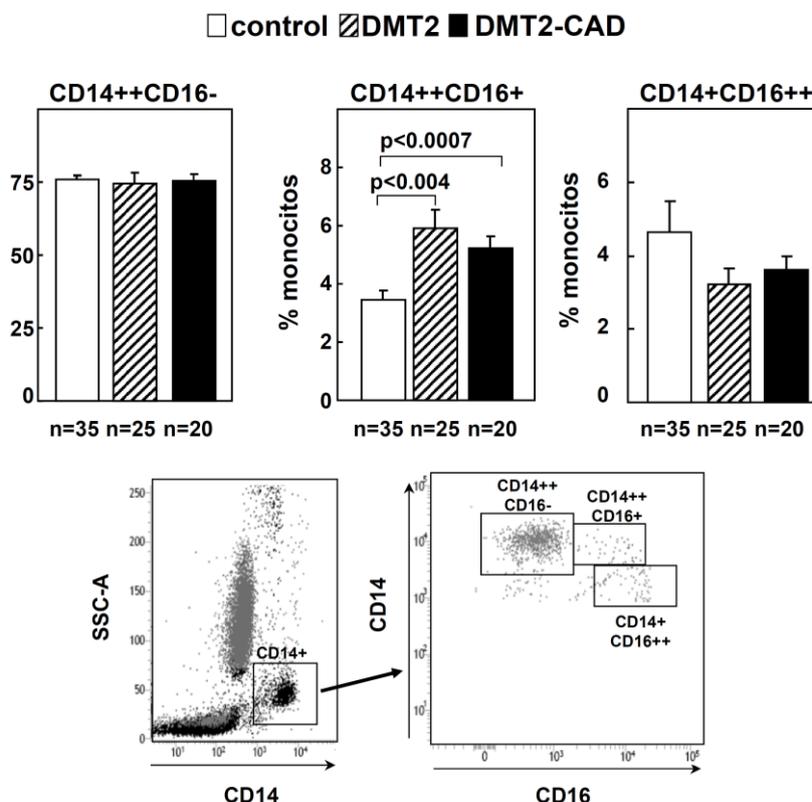


Figura 38. Caracterización de monocitos circulantes en los tres grupos de sujetos. Porcentajes de monocitos circulantes CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺⁺CD16⁺ y CD14⁺CD16⁺⁺ relativizado al total de leucocitos en los tres grupos de pacientes. Plot representativo del análisis de las subpoblaciones de monocitos mediante citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

El análisis de los mediadores inflamatorios no mostró cambios en los niveles circulantes en plasma de las citoquinas IFN γ ni IL17A entre los tres grupos (**Figura 39**). Sin embargo, los niveles circulantes en plasma de la citoquina antiinflamatoria IL4 fueron significativamente inferiores en pacientes DMT2 y DMT2-CAD comparado con los observados en los controles (**Figura 39**, panel central $p=0.05$ y $p<0.005$, respectivamente). Por lo tanto, el desarrollo de DMT2 y CAD se asocia con cambios en las células T, con cambios en el fenotipo de los monocitos y con bajos niveles de IL4.

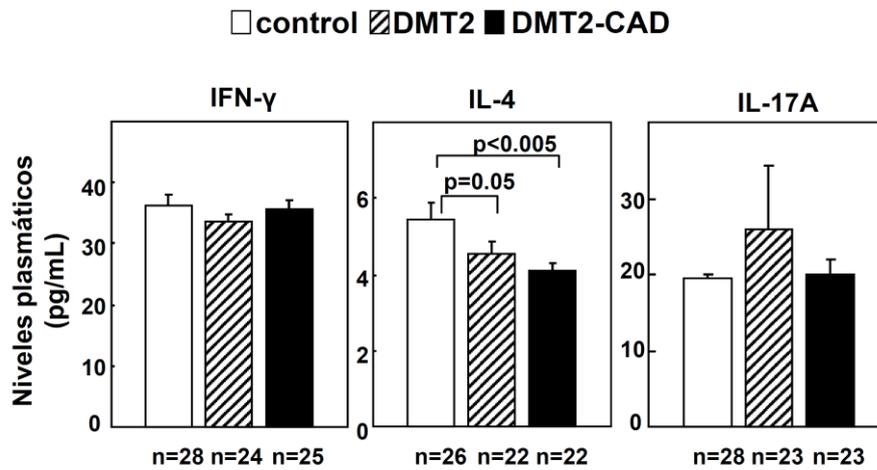


Figura 39. Caracterización de citoquinas circulantes en los tres grupos de sujetos. Niveles circulantes en plasma de IFN γ , IL4 e IL7A. Se realizó el análisis estadístico mediante un test One-way ANOVA

Para profundizar en la conexión entre la DMT2 y DMT2-CAD y el fenotipo de los leucocitos se llevaron a cabo estudios de correlación (**Figura 40A**). El análisis mostró una correlación inversa entre los niveles de Treg y el índice HOMA-RI (**Figura 40A**, $p < 0.0006$). Por el contrario, no se encontraron correlaciones significativas entre células T CD3+CD69+ o monocitos CD14++CD16+ y CD14+CD16++ y el índice HOMA-RI.

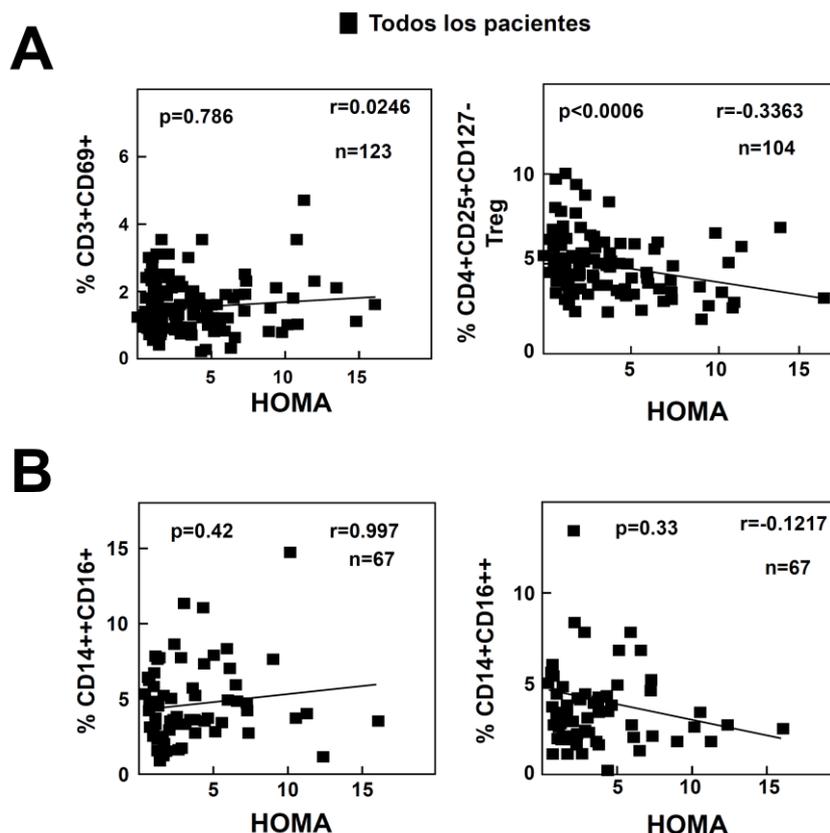


Figura 40. Estudios de correlación en sujetos control, DMT2 y DMT2-CAD. Correlación entre el índice HOMA-RI y niveles circulantes de **(A)** células Treg (CD4+CD25+CD127-) y CD3+CD69+ y **(B)** subtipo de monocitos CD14++CD16+ y CD14+CD16++. Los datos se muestran como puntos individuales correspondientes a cada uno de los sujetos. El análisis estadístico se realizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Estos estudios sugieren que el índice HOMA-RI produce un cambio de fenotipo en las células Treg. Dado el papel de las células Treg en la modulación de la inflamación, estos resultados también sugieren que éstas podrían ser la causa del cambio de fenotipo observado en los leucocitos circulantes. Por otro lado, la ausencia de diferencias entre sujetos DMT2 y DMT2-CAD indica que la presencia de CAD no agrava el fenotipo proinflamatorio. Sin embargo no se puede descartar una influencia significativa en los pacientes DMT2 de las terapias más agresivas aplicadas a estos sujetos con el fin de prevenir los eventos agudos asociados al CAD.

1.3.4. El tratamiento con insulina produce un cambio en el fenotipo de los linfocitos T

Para entender la conexión entre el cambio en el fenotipo de los linfocitos T y el progreso de la enfermedad, se realizaron experimentos *in vitro* con linfocitos aislados. Dado que la hiperinsulinemia es uno de los principales determinantes en el desarrollo de la aterosclerosis y la vulnerabilidad de placa (Martinez-Hervas et al., 2014), y ésta última es una de las principales causas de CAD, se estudió el efecto de la insulina en el fenotipo de los linfocitos.

El análisis de los linfocitos T presentó un aumento en el porcentaje de la subpoblación de células T activadas CD3+CD69+ en las células tratadas con insulina comparado con las células control sin tratar (**Figura 41A**, panel izquierdo, $p < 0.03$). Por el contrario, el porcentaje de células Treg (CD4+CD25+CD127-) estuvo significativamente reducido en las células tratadas con insulina en comparación con los porcentajes de las células control sin tratar (**Figura 41A**, panel derecho, $p < 0.005$). El análisis de expresión en los linfocitos no mostró diferencias en los niveles de expresión de los genes *Cdkn2a* ($p16^{Ink4a}$), *Cdkn2b* y *Cdkn2bas* en las células tratadas con insulina en comparación con las células control (**Figura 41B**).

El tratamiento con insulina produce un desequilibrio de células T consistente en bajos niveles de Treg y niveles aumentados de células T activadas.

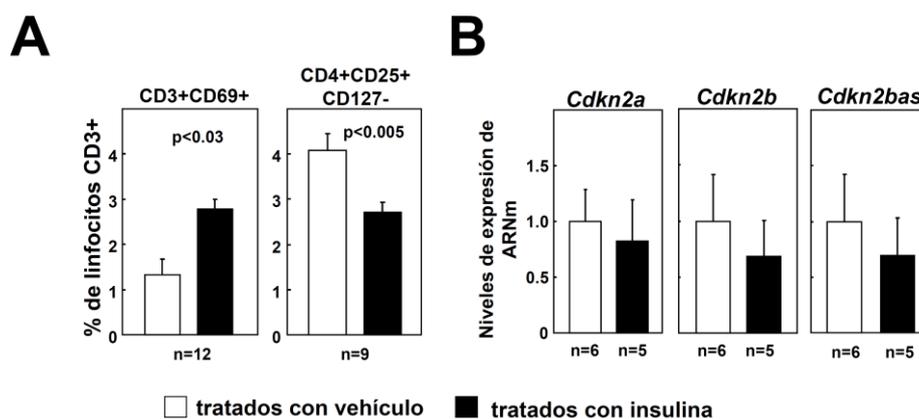


Figura 41. Efecto de los altos niveles de insulina sobre el fenotipo de los leucocitos. (A) Análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones de linfocitos T CD3+CD69+ y células Treg (CD4+CD25+CD127-) tratadas con 400 nM de insulina, o vehículo durante tres días. **(B)** Niveles de expresión de ARNm de *Cdkn2a*, *Cdkn2b* y *Cdkn2bas* de linfocitos tratados con insulina y sin tratar. Los niveles de ARNm se normalizaron con *gapdh* y se relativizaron a los niveles de ARNm de las células sin tratar. Para el análisis estadístico se usó un test t-Student.

2. Estudio del papel de la lipasa hepática en la homeostasis de la glucosa, en la esteatosis hepática y en la aterosclerosis diabética

2.1. Estudio del papel de la lipasa hepática en la homeostasis de la glucosa y en la esteatosis hepática

2.1.1. Caracterización metabólica de los ratones *WT* y *HL*^{-/-} sometidos a dieta rica en grasa y colesterol

Para estudiar el papel de la HL en el metabolismo de la glucosa y en el desarrollo de la esteatosis hepática se utilizaron ratones *WT* y ratones *HL*^{-/-} sometidos a dieta AGAC durante 4 meses. Los ratones deficientes en HL mostraron niveles de colesterol total ($p < 0.0001$), colesterol HDL ($p < 0.02$), triglicéridos ($p < 0.0003$) y NEFA ($p < 0.02$) (**Figura 42A**) superiores a los ratones *WT*. No se observaron cambios en el peso corporal entre genotipos (**Figura 42B**). Los niveles de glucosa en estado de ayuno no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de ratones pero los ratones *HL*^{-/-} mostraron un aumento en los niveles de glucosa en estado de alimentación en comparación con los ratones *WT* (**Figura 42C**, $p < 0.02$). Los niveles de insulina fueron indistinguibles entre ambos grupos de ratones tanto en estado de ayuno como en estado de alimentación (**Figura 42D**).

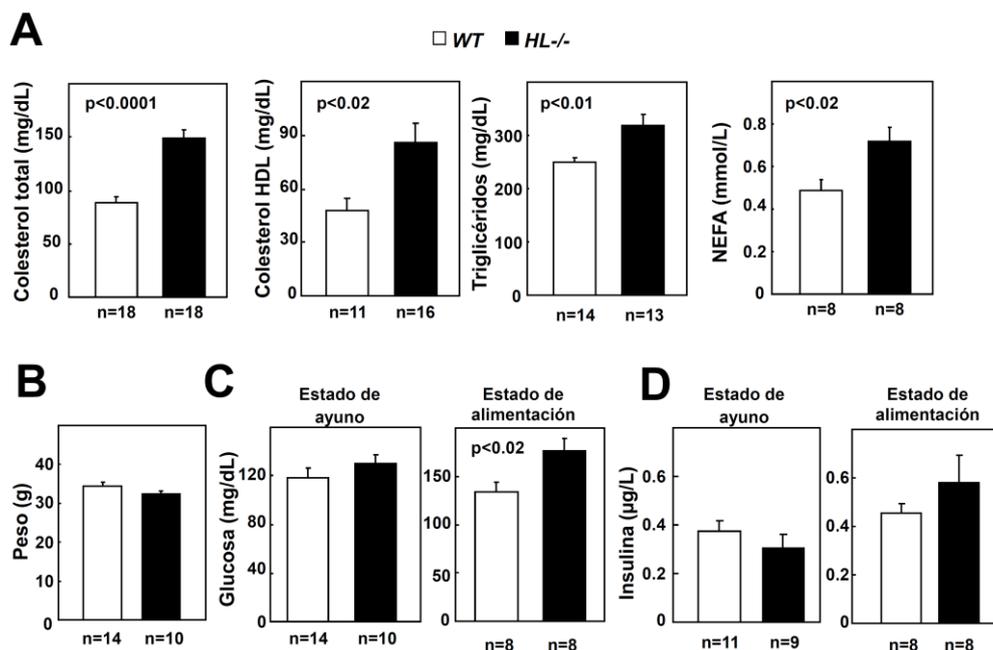


Figura 42. Parámetros plasmáticos en los ratones *WT* y *HL*^{-/-} alimentados durante 4 meses con dieta AGAC. (A) Niveles plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos y ácidos grasos no esterificados (NEFA). (B) Peso corporal en ambos grupos de ratones. (C) Niveles plasmáticos de glucosa en ratones ayunados durante toda la noche (panel izquierdo) y en estado de alimentación (panel derecho). (D) Niveles plasmáticos de insulina en ratones ayunados toda la noche (panel izquierdo) y en estado de alimentación (panel derecho). El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

Resultados

La caracterización del metabolismo de carbohidratos mediante análisis por TTG mostró intolerancia a la glucosa en los ratones *HL*^{-/-}, demostrado con un mayor AUC_{glucosa} (**Figura 43A**, panel superior gráfico derecho $p < 0.01$), en comparación con los ratones *WT*. De manera similar, los niveles de insulina durante el TTG revelaron una disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa en los ratones *HL*^{-/-}, demostrado por una disminución en el parámetro AUC_{insulina} , en comparación con los ratones *WT* (**Figura 43A**, panel inferior $p < 0.03$). No se encontraron diferencias en la sensibilidad a la insulina analizada mediante el TTI y su correspondiente AUC_{glucosa} (**Figura 43B**) o en el índice HOMA-RI (**Figura 43C**). El análisis de la secreción de insulina *in vitro* en los islotes aislados de los ratones con dieta AGAC, mostraron una secreción reducida en ratones *HL*^{-/-} comparado con los ratones *WT* (**Figura 43D**, $p < 0.006$). Así, la deficiencia de HL en ratones alimentados con dieta AGAC durante 4 meses produce intolerancia a la glucosa y un fallo en la secreción de la insulina estimulada por glucosa.

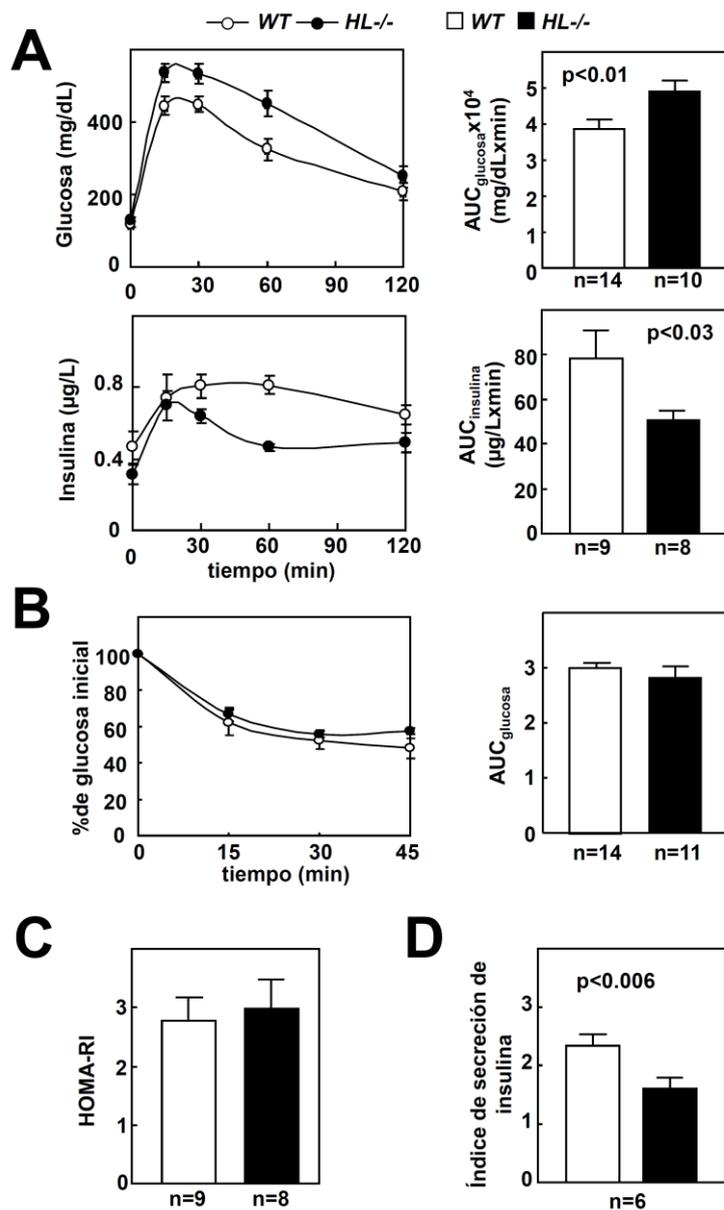


Figura 43. La deficiencia de HL produce intolerancia a la glucosa en ratones alimentados durante 4 meses con dieta AGAC. (A) Niveles de glucosa plasmática (panel superior) y de insulina (panel inferior) a diferentes tiempos del TTG en ratones *WT* y *HL^{-/-}*. Valores de $AUC_{glucosa}$ y $AUC_{insulina}$ (paneles derechos) calculados a partir de las curvas generadas de glucosa vs tiempo e insulina vs tiempo respectivamente. **(B)** Niveles de glucosa (en porcentaje relativo a los niveles iniciales de glucosa) durante el TTI con 0.5U/Kg de peso corporal de insulina en ratones ayunados durante 4 horas. El gráfico de la derecha muestra el $AUC_{glucosa}$ de los dos grupos de ratones. **(C)** Índice HOMA-RI en ambos grupos. **(D)** Secreción de insulina *in vitro* de islotes aislados de ratones *WT* y *HL^{-/-}*. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.1.2. Los ratones *HL*^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasa y en colesterol presentan un aumento en el contenido de triglicéridos en el hígado

Varios estudios han demostrado la existencia de una compleja relación entre el hígado graso, la dislipidemia y el desajuste en el metabolismo de la glucosa, por lo que se procedió a la caracterización del hígado. El análisis del contenido de lípidos hepáticos mostró mayores niveles de triglicéridos en el hígado de ratones *HL*^{-/-} comparado con los ratones *WT* (**Figura 44A**, $p < 0.04$, panel izquierdo). Consistente con esto, se observó un aumento del tamaño de las gotas lipídicas en los ratones *HL*^{-/-} comparado con los ratones *WT* (**Figura 44A**). El análisis inmunohistológico del contenido en macrófagos o células de Kupffer mediante el marcador F4/80 también mostró un aumento en la infiltración de macrófagos en el hígado de los ratones *HL*^{-/-} comparado con los ratones *WT* (**Figura 44B**, $p < 0.03$). De acuerdo con un aumento en el infiltrado inflamatorio, el análisis de la expresión de citoquinas proinflamatorias demostró un incremento de los niveles de ARNm de *Mcp1* en el hígado de los ratones *HL*^{-/-} comparado con los ratones *WT* (**Figura 44C**, panel izquierdo, $p < 0.03$). No se observaron diferencias en los niveles de expresión del ARNm de la citoquina *Tnfa* entre ambos grupos de ratones (**Figura 44C**, panel derecho).

Estos resultados indican que la deficiencia de la HL en los ratones alimentados con dieta AGAC incrementa la enfermedad del hígado graso y la inflamación hepática.

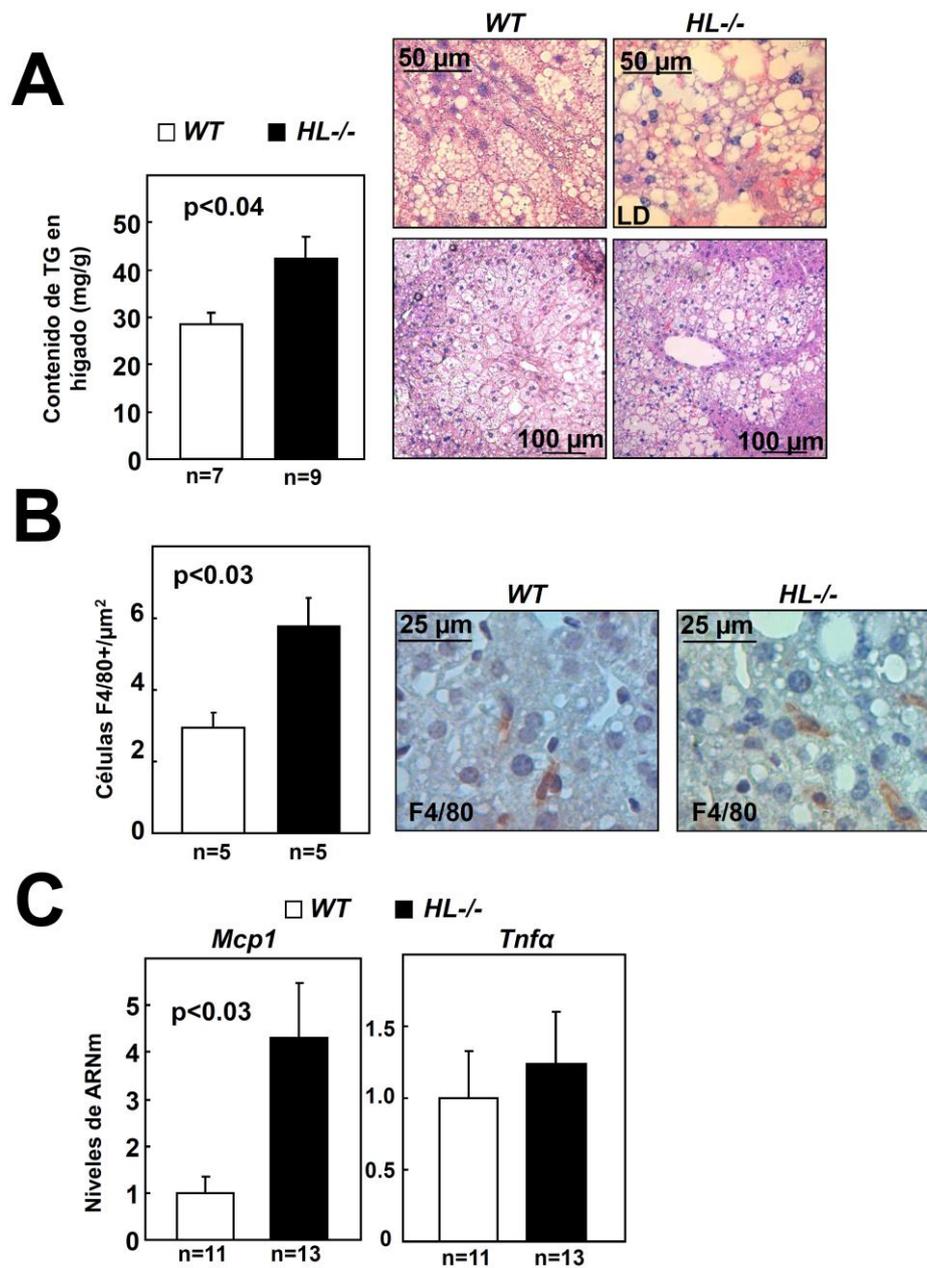


Figura 44. Caracterización del hígado en los ratones WT y HL-/-. (A) Análisis del contenido de triglicéridos en el hígado de ambos grupos de ratones. Imágenes de la tinción de hematoxilina-eosina mostrando gotas lipídicas (LD) en los dos grupos de ratones. (B) Contenido de macrófagos (células F4/80+ relativas al área hepática) en secciones transversales de hígado de los ratones. Se muestran imágenes representativas. (C) Niveles de expresión de ARNm de *Mcp1* y *Tnfa* en hígado. Los niveles de ARNm fueron normalizados con los niveles endógenos de ARNm de *ciclofilina* y relativizados a los niveles de ARNm de los ratones WT. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.1.3. Los ratones *HL*^{-/-} sometidos a dieta rica en grasa y colesterol muestran un aumento en la inflamación sistémica

Con el fin de caracterizar con más detalle la inflamación asociada a la esteatosis hepática observada en los ratones *HL*^{-/-} se analizó la inflamación sistémica. El análisis mostró un aumento de los niveles plasmáticos de MCP1 en los ratones *HL*^{-/-} en comparación con los niveles observados de los ratones *WT* (**Figura 45A**, $p=0.05$). No se observaron cambios en los niveles plasmáticos de TNF α (**Figura 45A**). El análisis de los leucocitos circulantes reveló un aumento en el porcentaje de monocitos CD115⁺ en los ratones *HL*^{-/-} en comparación con los ratones *WT* (**Figura 45B**, $p<0.03$). No se observaron cambios en las subpoblaciones de monocitos proinflamatorios Ly6C^{hi} y vigilantes Ly6C^{low} entre ambos genotipos (**Figura 45B**). El análisis de los linfocitos T demostró un aumento en el número total de células CD3⁺ (**Figura 45C**, $p<0.04$) y del subtipo de linfocitos T CD4⁺ (**Figura 45C**, $p<0.04$) sin cambios en la subpoblación de células CD8⁺ o en el porcentaje de las células activadas CD69⁺. El análisis de las células T reguladoras (Treg) circulantes no mostró diferencias entre ambos grupos de ratones pero el subtipo de las células T, Th17 (CD4⁺Th17⁺) aumentó de manera significativa en los ratones *HL*^{-/-} comparado con los ratones *WT* (**Figura 45D**, $p<0.008$).

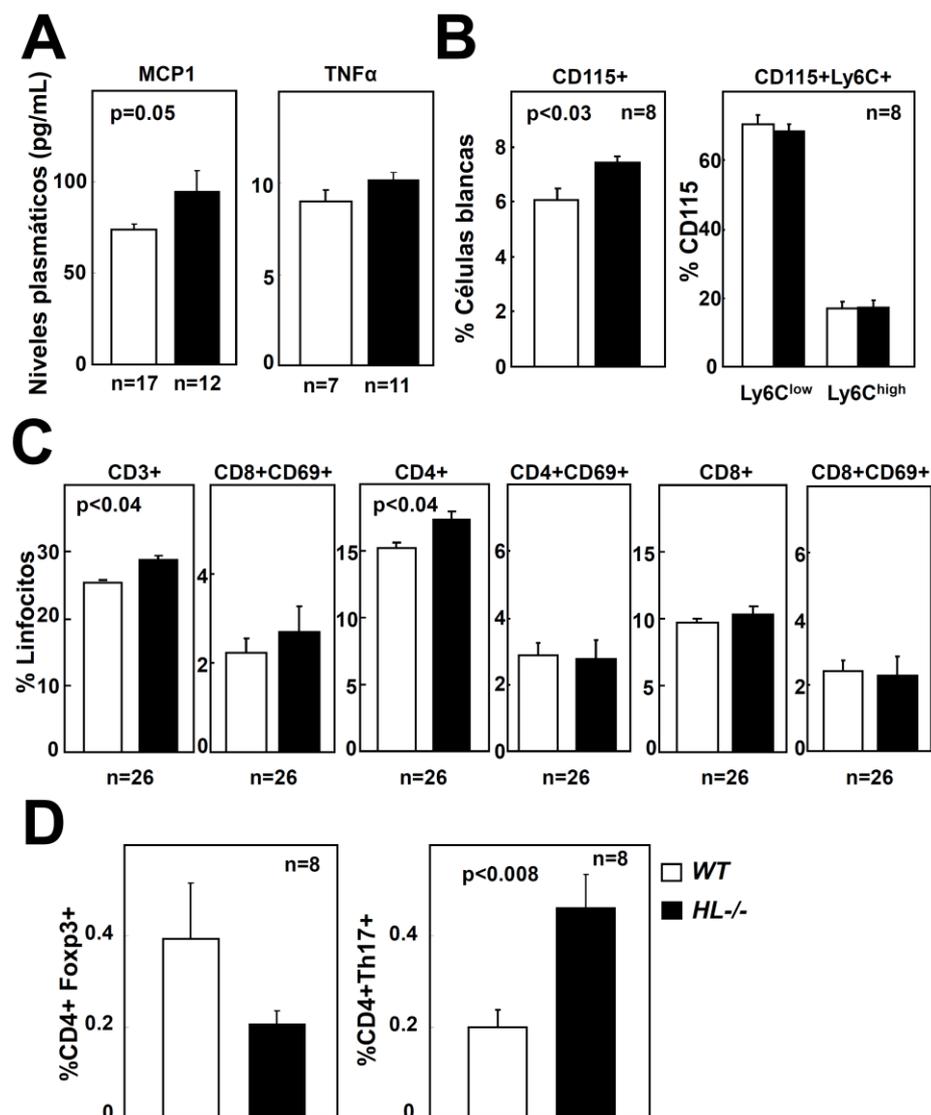


Figura 45. Análisis de la inflamación en los ratones WT y HL-/-. (A) Niveles plasmáticos circulantes de MCP1 y TNF α . (B) Porcentaje de monocitos circulantes identificados como células CD115+ por citometría de flujo y porcentaje de las subpoblaciones de monocitos Ly6C^{low} y Ly6C^{hi} en ambos grupos de ratones. (C) Porcentaje de linfocitos circulantes totales, CD3+, y activados CD3+CD69+, y de las subpoblaciones CD4+, CD4+CD69+, CD8+ CD8+CD69+ identificados por citometría de flujo. (D) Porcentaje de células Treg doblemente positivas para CD4+Foxp3+ y células CD4+Th17+ en ambos grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

En conjunto, estos resultados indican que la deficiencia de la HL en los ratones incrementa la inflamación y las células inflamatorias circulantes que incluyen monocitos, células T CD3+ y CD4+ y el subtipo de células T Th17.

2.1.4. Caracterización del páncreas en ratones *WT* y *HL*^{-/-}

Con el fin de estudiar las diferencias en la secreción de insulina observadas *in vivo* durante el TTG e *in vitro* en islotes aislados entre los ratones *HL*^{-/-} y *WT*, se procedió a la caracterización del páncreas de estos ratones. El análisis de los islotes pancreáticos mediante inmunohistoquímica anti-insulina, no mostró diferencias en el área relativa ocupada por las células β entre los ratones *HL*^{-/-} y *WT* (**Figura 46A**). De la misma manera, no se observaron diferencias en el ratio célula α/β , identificadas mediante inmunofluorescencia doble con anticuerpos anti-glucagón y anti-insulina (**Figure 46B**). El análisis de las células β proliferantes, identificadas con un doble marcaje de células positivas para Ki67/insulina, mostró tasas de proliferación similares en los ratones *HL*^{-/-} y *WT* (**Figure 46C**). Por lo que las diferencias observadas en la secreción de insulina *in vitro* e *in vivo* entre genotipos no se deben a diferencias en la masa de células β ni a la proliferación de éstas.

Dado el aumento de células inflamatorias circulantes en los ratones *HL*^{-/-}, se investigó la infiltración inflamatoria en el páncreas. El análisis de las células CD3⁺ en secciones de páncreas mostró un aumento en el porcentaje de células T en el páncreas exocrino de los ratones *HL*^{-/-} comparado con el de los ratones *WT* (**Figura 46D**, $p < 0.05$). Además, el análisis de los focos inflamatorios (FI) identificados como una masa de células invasoras del islote, reveló un incremento de la inflamación en el páncreas exocrino adyacente a los islotes en ratones *HL*^{-/-} comparado con los ratones *WT* (**Figura 46E**, $p < 0.007$).

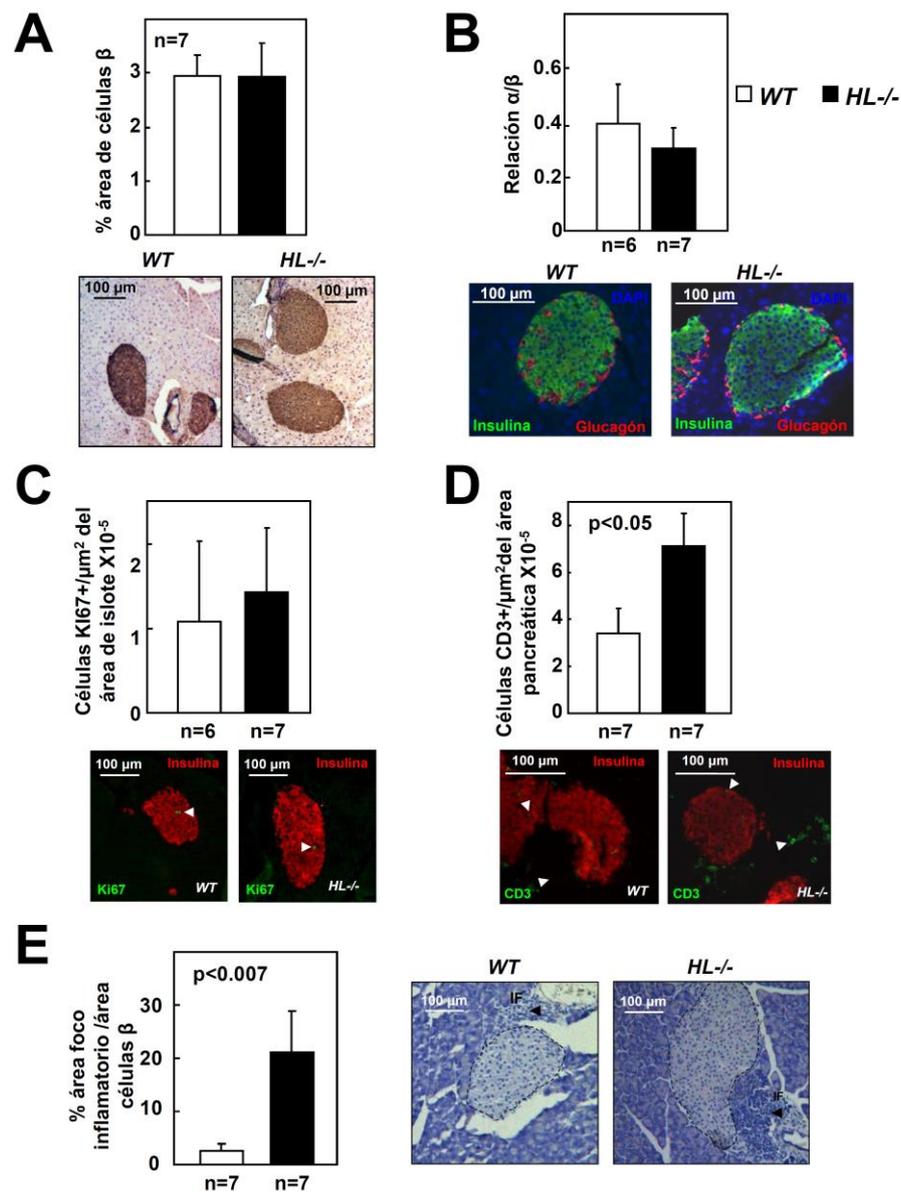


Figura 46. Caracterización de los islotes pancreáticos en los ratones WT y HL-/-. (A) Porcentaje del área de células β identificada mediante inmunohistoquímica anti-insulina. (B) Relación α/β en el páncreas en ambos grupos de ratones. (C) Cuantificación de la proliferación de las células β identificadas como número de células doblemente positivas para insulina/Ki67 relativizadas al área del islote, determinado por inmunofluorescencia. (D) Infiltrado de células T en el páncreas, identificadas como número de células CD3+ relativas al área pancreática en ambos grupos de ratones. (E) Cuantificación del área ocupada por focos inflamatorios (FI) en regiones del páncreas cercanas a los islotes en los dos grupos de ratones. Se muestran imágenes representativas de las inmunohistoquímicas, inmunofluorescencias y tinciones. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.1.5. Activación de las vías de estrés en los ratones WT y HL-/-

Estudios previos muestran un aumento de la activación de las vías de estrés de las MAPK asociado a la enfermedad del hígado graso (Sahini and Borlak, 2014). Dadas

Resultados

las diferencias observadas en la inflamación entre ratones *HL*^{-/-} y *WT* se procedió a la caracterización de estas vías de estrés. El análisis de expresión proteica mostró un incremento en los niveles de la proteína pp38 activada en el hígado de los ratones *HL*^{-/-} comparado con los niveles de la proteína activada pp38 en el hígado de los ratones *WT* (**Figura 47A** $p < 0.003$). Del mismo modo, el análisis de los niveles proteicos de la forma activada de SAPK/JNK (pSAPK/JNK) reveló niveles aumentados en el hígado de los ratones *HL*^{-/-} en comparación con los ratones *WT* (**Figura 47B** $p < 0.01$). No se observaron diferencias en los niveles de ARNm de *p38* y *SapK/Jnk* entre los dos genotipos (**Figura 47C**). Estos resultados demuestran que el aumento del estado inflamatorio en los ratones *HL*^{-/-} alimentados con dieta AGAC va acompañado por un aumento en la activación de las quinasas de estrés mediadas por p38 y SAPK/JNK.

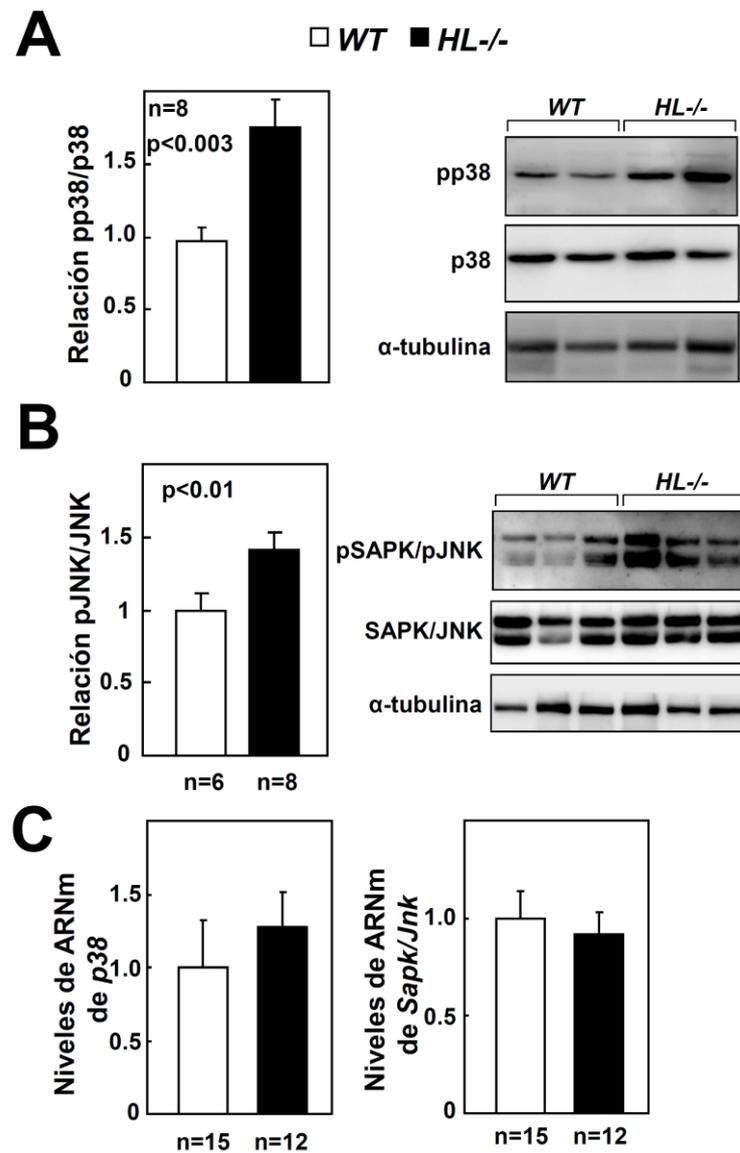


Figura 47. Expresión de las estrés MAPK en el hígado de los ratones WT y HL-/-. (A) Cuantificación de los niveles de las proteínas pp38 y p38 en el hígado de ambos genotipos. (B) Cuantificación de los niveles de proteína de pSAPK/JNK y SAPK/JNK en el hígado de los dos grupos de ratones. Las formas fosforiladas se normalizaron con los niveles totales de p38 y SAPK/JNK. Se muestran blots representativos de las cuantificaciones y los niveles de la proteína α -tubulina como control de carga. (C) Cuantificación de los niveles de expresión del ARNm de *p38* (panel izquierdo) y *Sapk/Jnk* (panel derecho) en los ratones. Los niveles de expresión de ARNm se normalizaron a los niveles de expresión de *ciclofilina* y relativizados a los niveles de ARNm del ratón WT. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.1.6. La deficiencia de HL no es suficiente para inducir esteatosis hepática en ratones alimentados con dieta control

El colesterol de la dieta es un importante factor de riesgo para la progresión de NAFLD (Wouters et al., 2008), por lo que se caracterizaron los ratones alimentados con dieta control (**Figura 48**). El análisis mostró que, comparado con ratones *WT*, los ratones *HL*^{-/-} alimentados con dieta control desarrollan un aumento de los niveles de colesterol total y triglicéridos (**Figura 48A**, $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) sin cambios en el peso corporal, ni en los niveles plasmáticos de glucosa e insulina (**Figura 48B**). El análisis mediante el TTG mostró un aumento del AUC_{glucosa} , (**Figura 48C**, panel derecho $p < 0.05$), y por lo tanto de la intolerancia a la glucosa, en los ratones *HL*^{-/-} comparado con ratones *WT*. No se observaron cambios en la liberación de insulina estimulada por glucosa, como reveló el AUC_{insulina} (**Figura 48C**, panel inferior) ni en la sensibilidad a la insulina durante el TTI, como se muestra por el AUC_{glucosa} (**Figura 48D**). A diferencia de los ratones alimentados con dieta AGAC, la ausencia de HL en los ratones alimentados con dieta control produce intolerancia a la glucosa sin cambios en la secreción de insulina estimulada por glucosa.

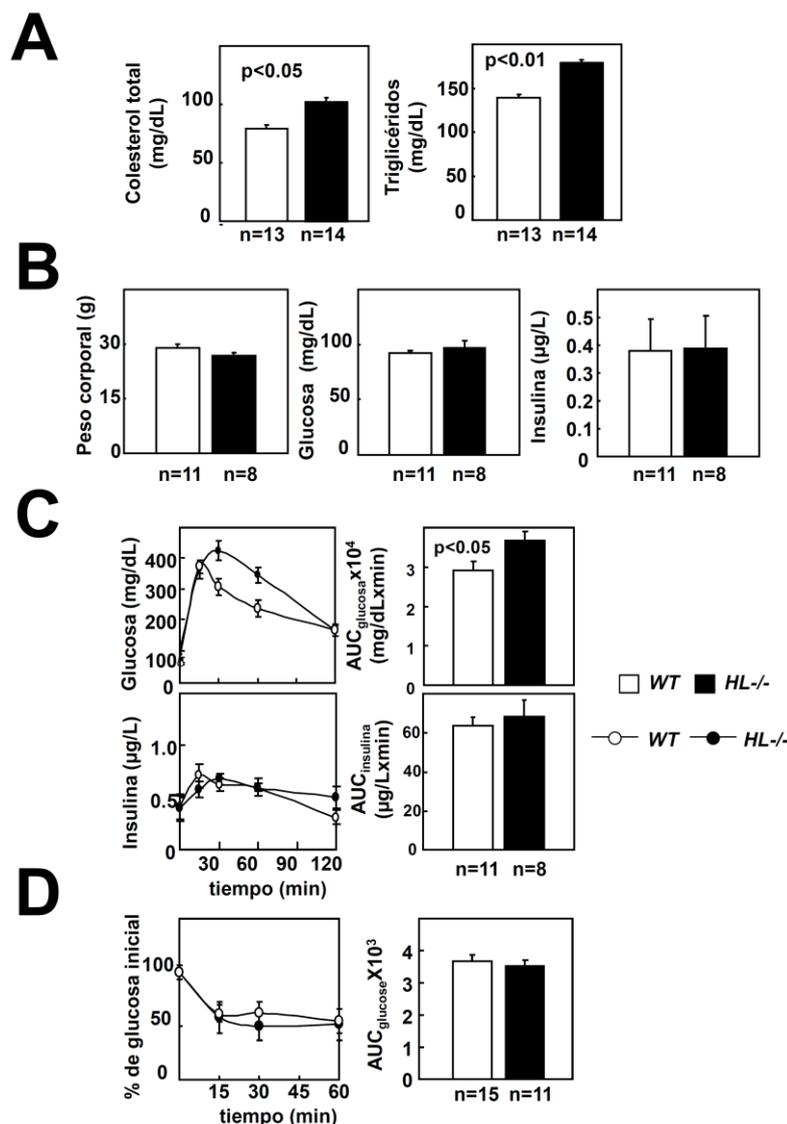


Figura 48. Análisis metabólico en ratones *WT* y *HL-/-* de 6 meses de edad alimentados con dieta control. (A) Colesterol total y triglicéridos. (B) Peso corporal, niveles plasmáticos de glucosa e insulina en ratones ayunados toda la noche. (C) Niveles plasmáticos de glucosa (panel superior) y de insulina (panel inferior) a diferentes tiempos del TTG en ratones *WT* y *HL-/-*, y los parámetros $AUC_{glucosa}$ y $AUC_{insulina}$ correspondientes al test (paneles derecha). (D) Niveles de glucosa (en porcentaje relativo a los niveles de glucosa inicial) durante el TTI a 0.5U/KgBW en ratones ayunados durante 4h. El gráfico derecho muestra el parámetro $AUC_{glucosa}$ del TTI. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

El análisis de las secciones hepáticas teñidas con hematoxilina/eosina en los ratones *WT* y *HL-/-* alimentados con dieta control, no reveló diferencias en el contenido de triglicéridos en el hígado y en la esteatosis (**Figura 49A**). Consistente con estos resultados, no se observaron diferencias en los niveles circulantes en plasma de MCP1 ni en la activación de la vía inflamatoria de estrés p38 (**Figura 49B, C**) entre los ratones indicando una inflamación similar en los ratones *HL-/-* y *WT* alimentados con

dieta control. El análisis del páncreas mostró un aumento de los focos inflamatorios, pero éste no fue significativo (**Figura 49D**). No se observaron diferencias en el contenido de células CD3+ entre genotipos (**Figura 49E**). Estos resultados indican que la deficiencia en HL no tiene efecto en la esteatosis hepática o en la inflamación en los ratones alimentados con dieta control.

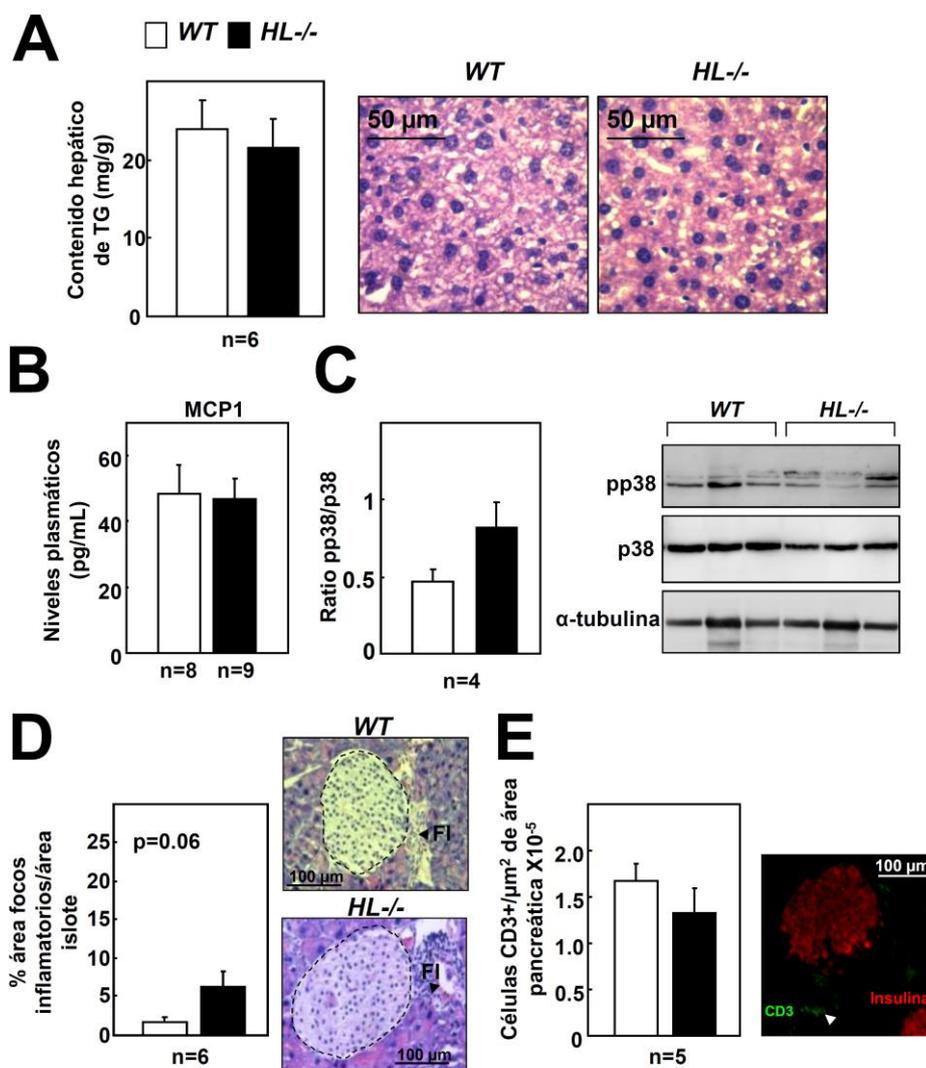


Figura 49. Caracterización del hígado y del páncreas en ratones WT y HL-/- de 6 meses de edad alimentados con dieta control. (A) Análisis del contenido de triglicéridos en el hígado de ambos grupos de ratones. Imágenes de secciones teñidas con hematoxilina/eosina que muestran la morfología hepática. **(B)** Niveles circulantes en plasma de MCP1 en ratones WT y HL-/. **(C)** Análisis de los niveles de proteína p38 activada (pp38) y p38 en el hígado. Se muestran blots representativos. **(D)** Cuantificación del área ocupada por los focos inflamatorios en regiones del páncreas cercanas a los islotes. **(E)** Infiltrado de células T en el páncreas identificado como células CD3+. Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica y las tinciones. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.2. Estudio del papel de la lipasa hepática en la aterosclerosis acelerada por resistencia a insulina y en la inflamación

2.2.1. Caracterización metabólica de los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* con inactivación génica de la HL alimentados con dieta aterogénica durante 2 meses

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la inactivación total o parcial del gen *Irs2* en los ratones *apoE^{-/-}* produce características del SMet y de la DMT2 como son la intolerancia a la glucosa, la RI, la dislipidemia y el agravamiento de la aterosclerosis (Gonzalez-Navarro et al., 2007; Gonzalez-Navarro et al., 2008; Martinez-Hervas et al., 2014). Para investigar el papel de la HL en la aterosclerosis diabética se utilizaron ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* en los que se estudió la inactivación génica de la HL.

Ratones macho *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{+/+}* y *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* de 2 meses de edad fueron alimentados con una dieta AGAC durante 2 meses y fueron caracterizados. Consistente con el papel de la lipasa hepática en el metabolismo lipídico, el análisis de los niveles lipídicos (**Figure 50A**) mostró un incremento en el colesterol apo-B ($p < 0.03$) y de triglicéridos ($p = 0.05$), y una disminución del colesterol HDL ($p < 0.05$) en los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* en comparación con los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{+/+}*. No se observaron cambios en el peso, en la glucosa basal en ayunas ni en los niveles de insulina entre los dos grupos de ratones (**Figura 50B**).

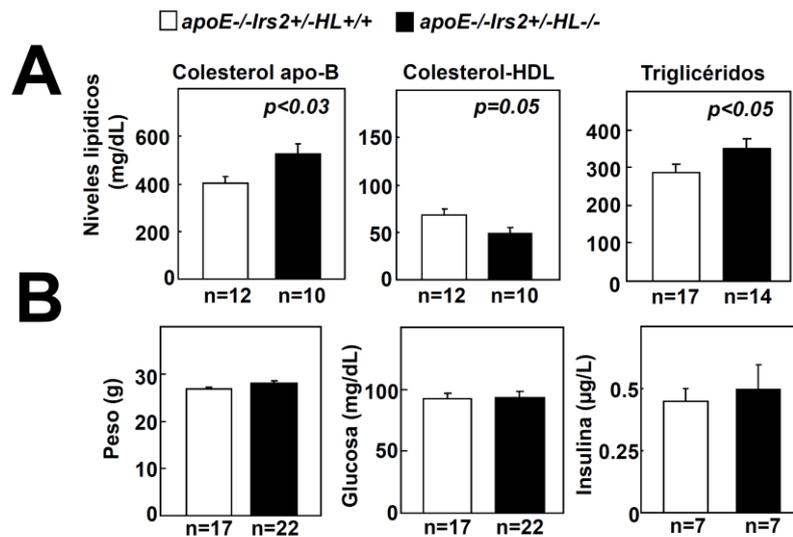


Figura 50. Caracterización metabólica de los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL+/+* y *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* alimentados con dieta AGAC durante 2 meses. (A) Niveles plasmáticos de colesterol-apoB, colesterol-HDL y triglicéridos de ambos grupos de ratones. (B) Peso corporal y niveles plasmáticos de glucosa e insulina en ayunas. El análisis estadístico se realizó mediante un el test t-Student.

El análisis del metabolismo de carbohidratos mediante el TTG no mostró diferencias en la tolerancia a la glucosa entre los dos genotipos, medida como el $AUC_{glucosa}$ (Figura 51A, panel superior, gráfico derecho) o en la secreción de insulina durante el test, expresado como $AUC_{insulina}$ (Figura 51A, panel inferior, gráfico derecho). La sensibilidad a la insulina evaluada mediante el TTI, no mostró ningún efecto de la inactivación de la HL en los ratones *apoE-/-Irs2+/-* como se reveló en el parámetro de $AUC_{glucosa}$ (Figura 51B).

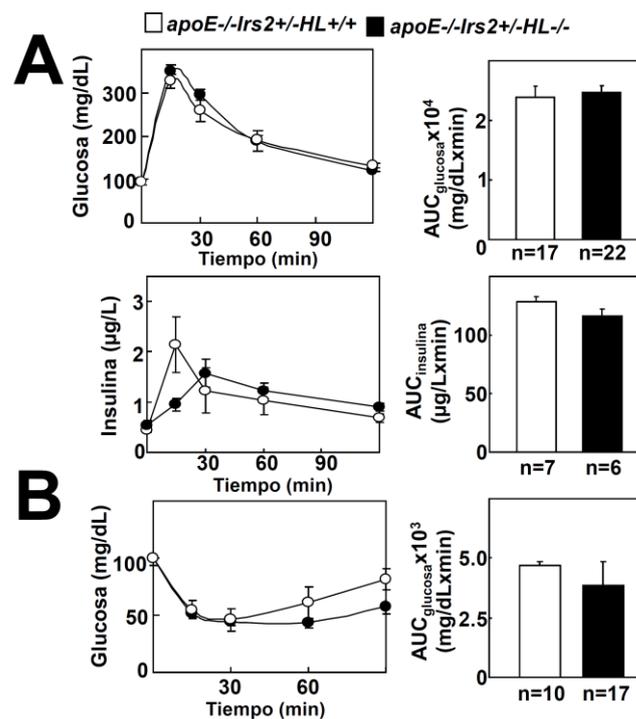


Figura 51. Caracterización metabólica de los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL+/+* y *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* alimentados con dieta AGAC durante 2 meses. (A) Niveles de glucosa en plasma durante el TTG (gráfico superior) y el AUC_{glucosa} generado de las medidas de glucosa tomada a diferentes tiempos del test (panel derecho) para los dos grupos de ratones. Niveles de insulina en plasma durante el TTG (gráfico inferior) y el AUC_{insulina} generado de las medidas de insulina a diferentes tiempos del test (panel derecho). **(B)** Niveles de glucosa (porcentaje relativo a los niveles iniciales de glucosa) durante el TTI en ratones ayunados durante 4 horas. El análisis estadístico se realizó mediante el test t-Student.

Para verificar que los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* y *apoE-/-Irs2+/-HL+/+* tienen un desajuste en el metabolismo glucémico, se compararon con sus respectivos controles no resistentes a insulina, los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* y ratones *apoE-/-Irs2+/-HL+/+* (**Figura 52**). Como era de esperar, la haploinsuficiencia de *Irs2* en los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* y *apoE-/-Irs2+/-HL+/+* produjo intolerancia a la glucosa, como muestran los valores aumentados del parámetro AUC_{glucosa}, en comparación con los ratones con el gen *Irs2* intacto (*apoE-/-Irs2+/-HL+/+* y *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* $p < 0.05$ y $p < 0.02$, respectivamente). No se observaron diferencias entre los ratones *HL+/+* o *HL-/-*. Así pues, la presencia o ausencia de HL en ratones *apoE-/-Irs2+/-* que exhiben intolerancia a la glucosa y RI no tiene un efecto adicional en el metabolismo de la glucosa.

Resultados

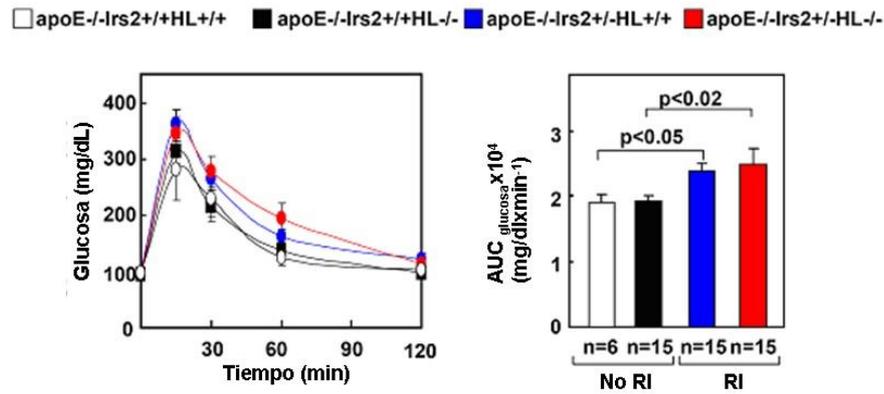


Figura 52. Estudio de la tolerancia a la glucosa en ratones con SMet-RI, *apoE^{-/-}Irs2^{+/+}HL^{+/+}* y ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/+}HL^{-/-}*, y en ratones sin RI, *apoE^{-/-}Irs2^{+/+}HL^{+/+}* y *apoE^{-/-}Irs2^{+/+}HL^{-/-}*. Niveles de glucosa durante el TTG (panel izquierdo) y el parámetro AUC_{glucosa} en los cuatro grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante el test One-way ANOVA.

El análisis de los lípidos y del metabolismo glucémico mostró resultados similares. Así, comparado con hembras *apoE^{-/-}Irs2^{+/+}HL^{+/+}*, las hembras *apoE^{-/-}Irs2^{+/+}HL^{-/-}* exhibieron un aumento del colesterol apo-B y una disminución del colesterol HDL. No se observaron cambios en los niveles de triglicéridos, peso corporal, niveles de glucosa en ayunas o en la tolerancia a la glucosa (**Figura 53**).

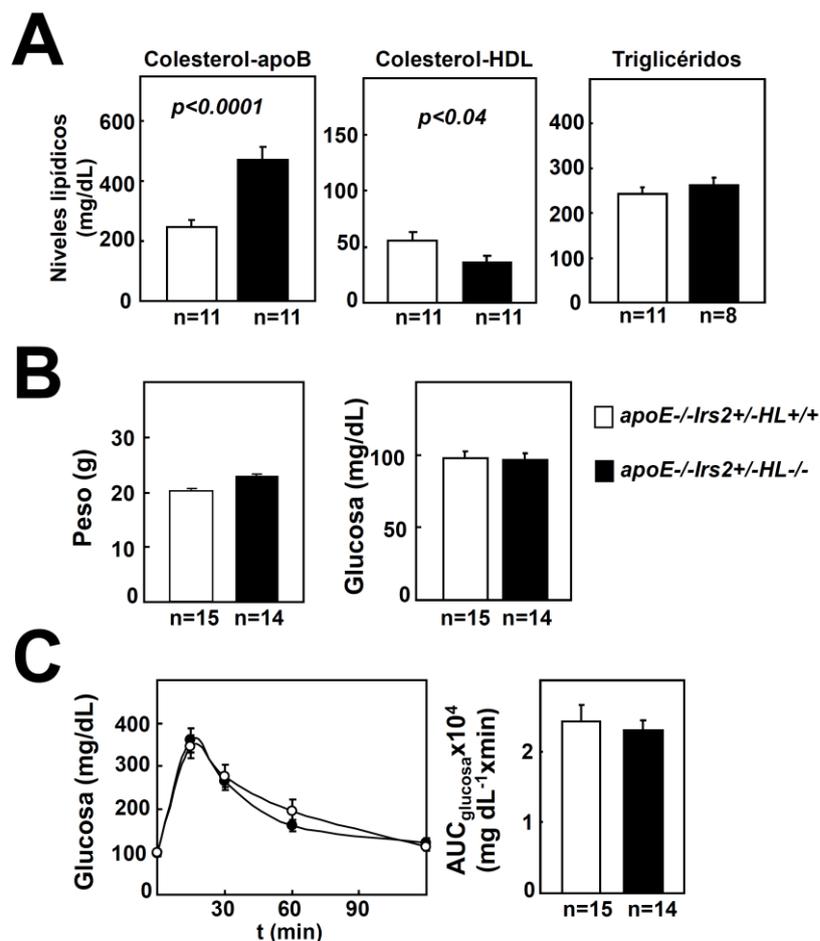


Figura 53. Caracterización metabólica de hembras *apoE-/-Irs2+/-HL+/+* y *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* alimentadas con dieta AGAC durante 2 meses. **(A)** Niveles plasmáticos de colesterol-apoB, colesterol-HDL y triglicéridos en ambos grupos de ratones. **(B)** Peso corporal y niveles plasmáticos de glucosa en ayunas. **(C)** Niveles de glucosa en plasma durante el TTG en los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL+/+* vs *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* (panel izquierdo) y el AUC generado de las medidas de glucosa a los diferentes tiempos del test (AUC_{glucosa}, panel derecho). El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.2.2. La disrupción génica de la HL en los ratones *apoE-/-Irs2+/-* alimentados con dieta aterogénica reduce la aterosclerosis y produce cambios en la composición de la placa

El análisis *en face* de la aterosclerosis en la aorta en machos mostró una disminución del tamaño de la lesión aterosclerótica tanto en el cayado aórtico (**Figura 54A**, $p < 0.01$) como en la aorta torácica (**Figura 54A**, $p < 0.03$) de ratones deficientes en HL en comparación con las lesiones de ratones macho *apoE-/-Irs2+/-HL+/+*. De manera similar, el tamaño de la lesión, medido como el ratio íntima/media en cortes transversales de corazón, también demostró una disminución de la placa de ateroma en la raíz aórtica (**Figura 54B**, panel superior, $p < 0.02$) y en la aorta ascendente

(Figura 54B, panel inferior $p < 0.04$) de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} comparado con el de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+}. Consistente con estos resultados, el porcentaje de células espumosas, las cuales juegan un papel importante en la formación de la lesión, fue inferior en los macrófagos del lavado peritoneal de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} comparado con los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+} (Figura 54C, $p = 0.05$).

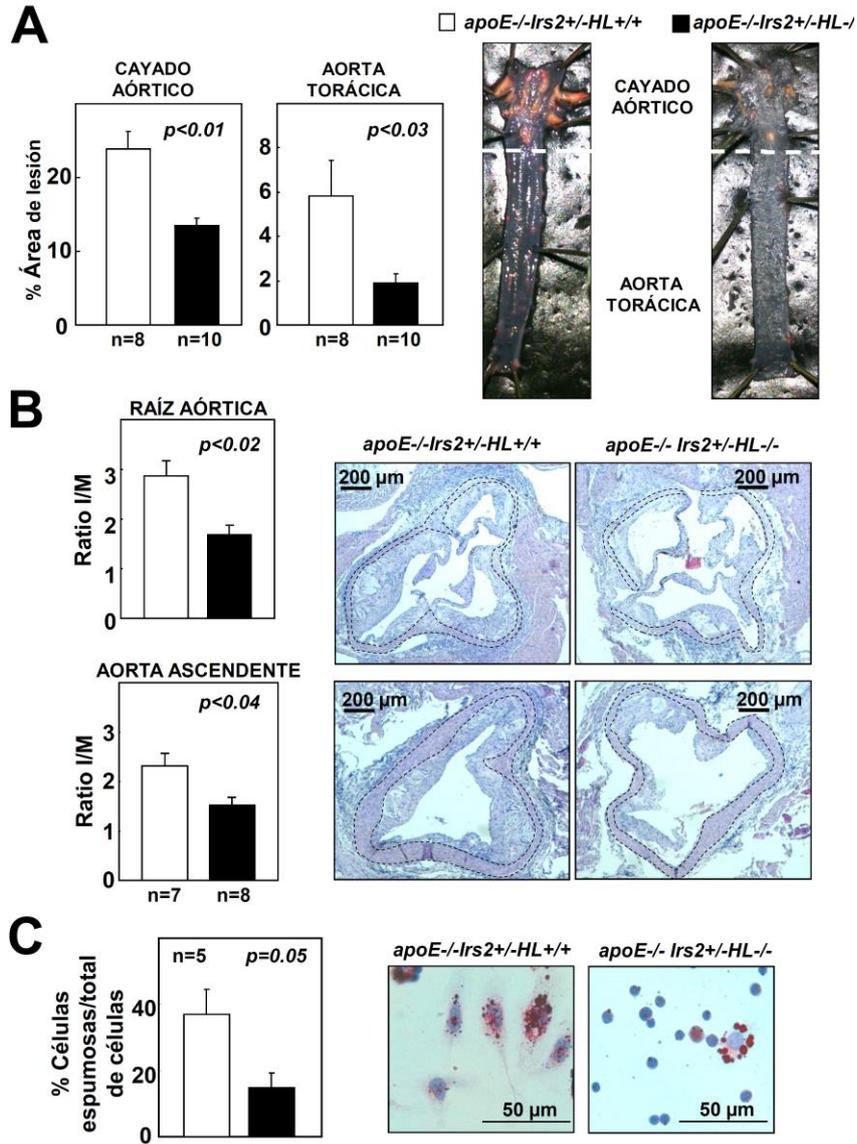


Figura 54. Análisis de la lesión aterosclerótica de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} tras 2 meses de dieta AGAC. (A) Análisis *en face* de la aterosclerosis en las aortas teñidas con Oil Red O en ambos genotipos. (B) Medida del tamaño de la lesión de ateroma como el ratio íntima-media en secciones transversales de la raíz aórtica y de la aorta ascendente. (C) Análisis *in vivo* de células espumosas determinado como el porcentaje de los macrófagos peritoneales que muestran en el citoplasma gotas lipídicas después de la tinción con Oil Red O. Se muestran imágenes representativas de las aortas (A), imágenes de las secciones de aorta teñidas con hematoxilina/eosina y (B) imágenes de los macrófagos peritoneales teñidos con Oil Red O (C). Las líneas discontinuas delimitan la media. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

Resultados similares fueron obtenidos en el análisis de la aterosclerosis en ratones hembras. El análisis *en face* demostró una reducción del tamaño de la lesión en el cayado aórtico y en la aorta torácica de los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* comparado con los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{+/+}* (**Figura 55A**, $p < 0.03$ y $p < 0.04$, respectivamente). También se observó una disminución de la lesión en las secciones transversales de las hembras *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}*, pero estas diferencias no fueron significativas (**Figura 55B**). Por lo tanto, la ateroprotección debida a la deficiencia de HL es dependiente de la región vascular aterogénica y es específica de género.

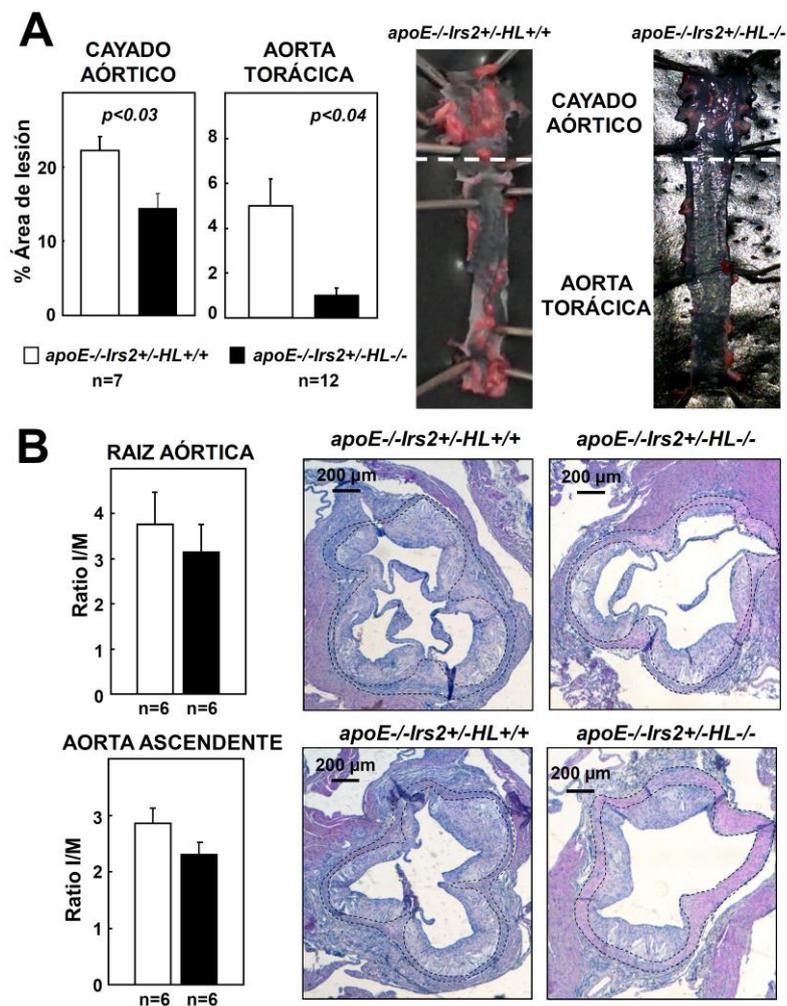


Figura 55. Análisis de la lesión aterosclerótica en las hembras *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{+/+}* y *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* tras 2 meses de dieta AGAC. **(A)** Análisis *en face* de la aterosclerosis en aortas enteras teñidas con Oil Red O en ambos grupos de ratones. **(B)** Tamaño de la lesión del ateroma medida como el ratio íntima-media en secciones de la raíz aórtica y de la aorta ascendente. Se muestran imágenes de las aortas y de la tinción con hematoxilina/eosina. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

Resultados

Para evaluar el impacto global de la deficiencia de la HL en combinación con una haploinsuficiencia del gen *Irs2*, se comparó el tamaño de la lesión ateromatosa de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/-} con sus respectivos controles con el gen *Irs2* intacto, ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/+}*HL*^{-/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/+}*HL*^{+/-} (**Figura 56**). Consistente con estudios previos (González-Navarro et al., 2004), la inactivación génica de la HL redujo significativamente el tamaño de la lesión en el cayado aórtico y en la aorta torácica en los ratones *apoE*^{-/-} (*apoE*^{-/-}*IRS2*^{+/+}*HL*^{-/-} vs *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/-} $p=0.05$ y $p<0.007$, respectivamente). De acuerdo con investigaciones previas (Gonzalez-Navarro et al., 2008), la lesión de ateroma aumentó significativamente en el cayado aórtico en los ratones RI *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/-} en comparación con los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/+}*HL*^{+/-} ($p<0.01$). La inactivación de la HL en los ratones RI *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-} disminuyó el desarrollo de la aterosclerosis en el cayado aórtico y en la aorta torácica (*apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} vs *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/-}, $p<0.0001$ y $p<0.003$ respectivamente). Estos resultados indican un papel proaterogénico de la HL en los estados hiperlipidémicos y de SMet/RI, y que el aumento de la aterosclerosis causada por la haploinsuficiencia del gen *Irs2* en ratones *apoE*^{-/-} disminuye tras la inactivación génica de la HL.

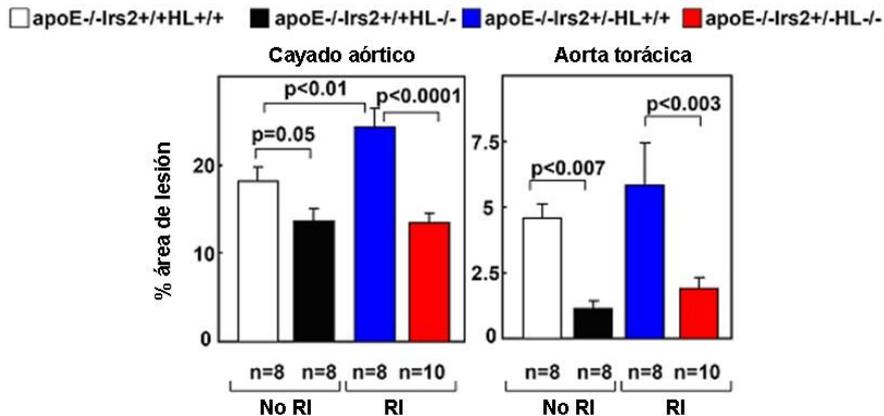


Figura 56. Desarrollo de la lesión ateromatosa en los ratones RI *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-}, y en los ratones no RI *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/+}*HL*^{+/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/+}*HL*^{-/-}. El análisis *en face* de la aterosclerosis en el cayado aórtico (panel izquierdo) y en la aorta torácica (panel derecho) en aortas enteras teñidas con Oil Red O de los cuatro grupos de ratones. El análisis estadístico se realizó mediante un test One-way ANOVA.

El análisis de la composición de la placa de ateroma mostró una disminución en el infiltrado inflamatorio consistente en una reducción en el contenido de macrófagos (**Figura 57A**, $p<0.03$) y de linfocitos T (**Figura 57B**, $p<0.05$) en la lesión de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} comparado con las lesiones de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/-}. El

contenido de colágeno en la placa de ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* fue significativamente inferior (**Figura 57C**, $p < 0.05$). Los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* también mostraron una disminución en el área del core necrótico (**Figura 57D**, $p < 0.05$) y un aumento en el grosor de la capa fibrosa (**Figura 57E**, $p < 0.05$) indicando una mayor estabilidad de la placa de ateroma.

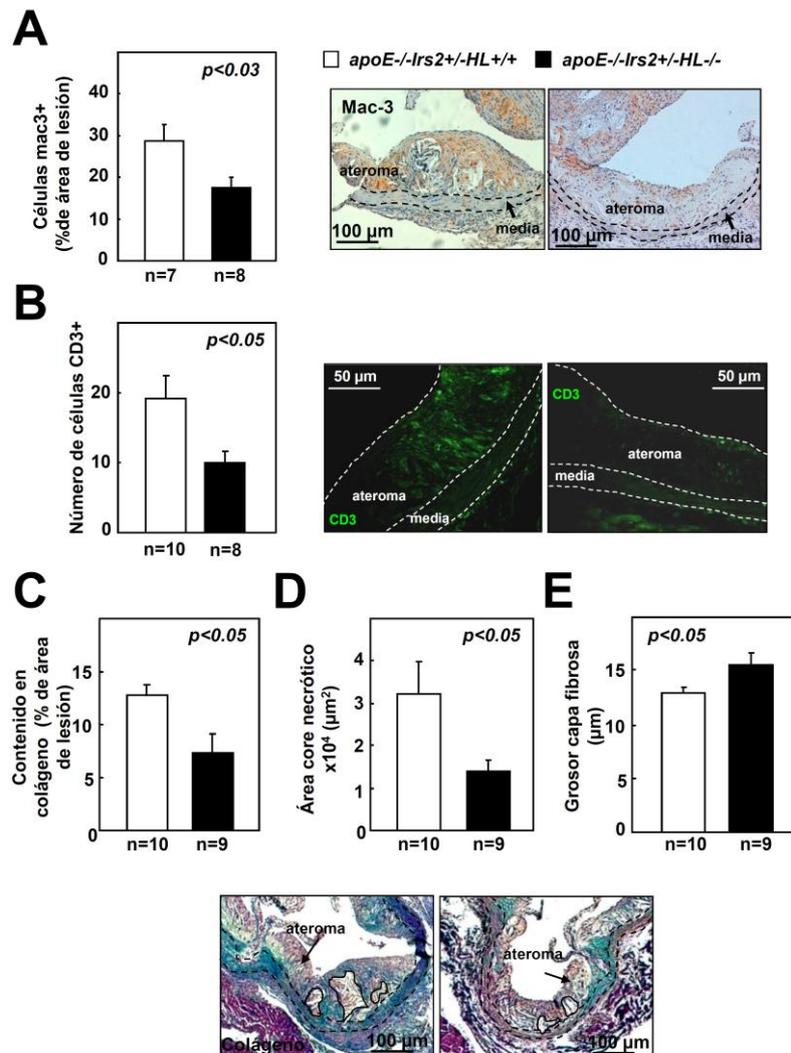


Figura 57. Análisis de la composición de la placa de ateroma en secciones de aorta en los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{+/-}* y *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* tras 2 meses de dieta AGAC. Contenido de (A) macrófagos (expresado en porcentaje de área en la lesión) y (B) linfocitos T (expresado como número de células en la lesión) detectados mediante anticuerpos contra marcadores específicos (Mac-3 y CD3, respectivamente). Cuantificación de (C) contenido de colágeno (expresado en porcentaje de área en la lesión), (D) área core necrótico (área en la lesión como μm^2) y (E) grosor de la capa fibrosa (en μm^2) cuantificado en la tinción tricrómica de Masson. Se muestran imágenes representativas de las tinciones, inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias. Las líneas discontinuas limitan la media, las líneas sólidas limitan el core necrótico. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.2.3. La disminución del tamaño de la lesión en los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* está asociada con una disminución de la inflamación

Dado el papel potencial de la HL en la inflamación y la disminución del infiltrado inflamatorio en la lesión ateromatosa de ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}*, se investigaron los niveles de mediadores inflamatorios y la activación de los leucocitos circulantes.

Los niveles circulantes de las citoquinas MCP1, TNF α e IL6 fueron significativamente inferiores en los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* en comparación con los niveles de los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{+/+}* (**Figura 58A**, $p < 0.01$, $p < 0.03$ y $p < 0.03$, respectivamente). Los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* también mostraron un porcentaje menor de monocitos proinflamatorios invasivos Ly6C^{hi} (**Figura 58B**, $p < 0.04$) y un incremento moderado, aunque no significativo, de los monocitos vigilantes o patrulladores Ly6C^{low} (**Figura 58B**). De manera similar, los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* mostraron una disminución en los porcentajes de linfocitos T activados CD3+CD69+ (**Figura 58C**, $p < 0.01$), de las células T CD4+ totales y activadas CD4+CD69+ (**Figura 58D**, $p < 0.03$ y $p < 0.04$, respectivamente), y de las células CD8+ totales y activadas CD8+CD69+ (**Figura 58D**, $p < 0.03$ y $p < 0.0002$, respectivamente). Se muestran plots representativos de la citometría de flujo (**imágenes en 58E**).

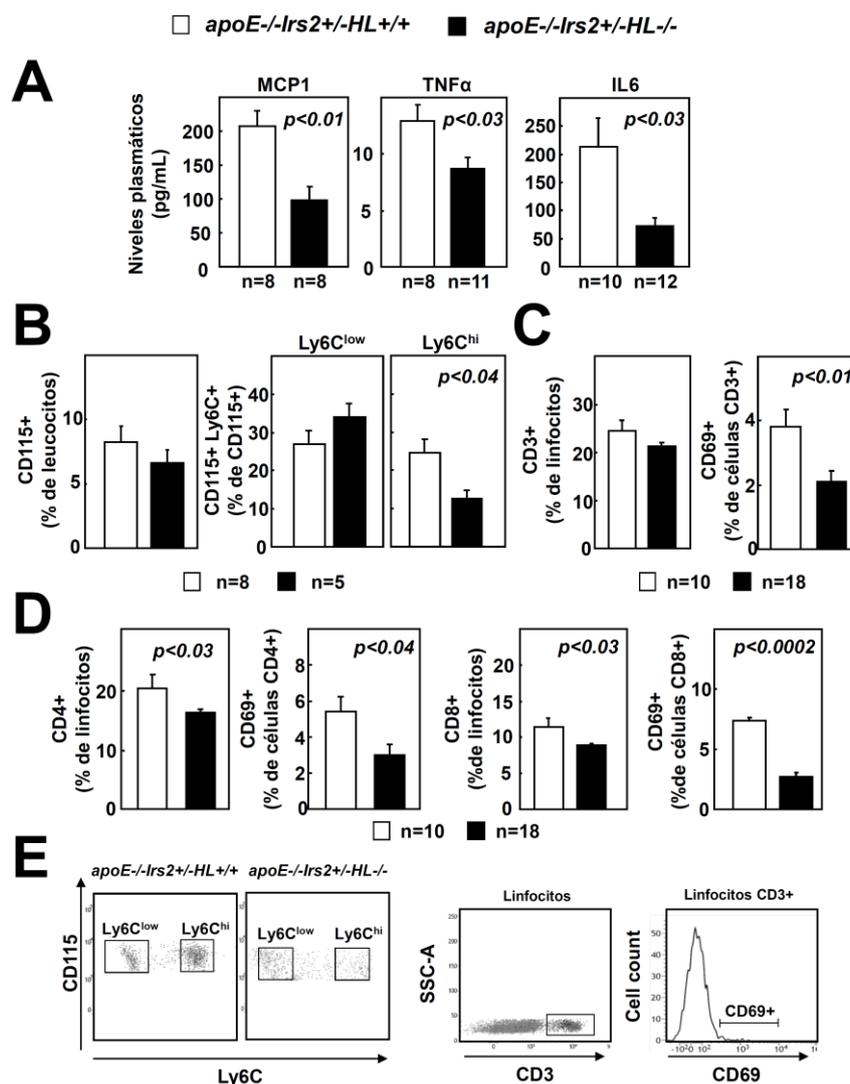


Figura 58. Análisis de la inflamación sistémica en los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{+/+}* y *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* tras 2 meses de dieta AGAC. **(A)** Niveles circulantes de MCP1, TNF α e IL6 en plasma. **(B)** Determinación por citometría de flujo de monocitos circulantes identificados como células CD115+ y las subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi} y Ly6C^{low} identificados en sangre. **(C)** Linfocitos circulantes totales y activados identificados como células CD3+ y CD3+CD69+ respectivamente. **(D)** Cuantificación de las células T CD4+ y CD8+ y de sus formas activadas CD4+CD69+ y CD8+CD69+. **(E)** Plots representativos de la citometría de flujo para monocitos y linfocitos. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.2.4. Los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* poseen una disminución de la vía LIGHT(TNSFS14)/Receptor de la linfotóxina- β (LT β -R)

Los cambios en la expresión de la HL se han asociado con cambios de expresión en el eje proinflamatorio LIGHT(TNFSF14)/Receptor de la linfotóxina- β (LT β -R)

(Chellan et al., 2013; Lo et al., 2007), por lo que se investigó la activación de esta vía inflamatoria.

Coincidiendo con una disminución en el desarrollo del ateroma, los niveles plasmáticos circulantes de LIGHT fueron inferiores en los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} comparado con los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+} (**Figura 59A**, $p < 0.02$). Consistente con estos hallazgos, las lesiones de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} mostraron niveles reducidos del contenido de células positivas para LT β -R comparado con los controles *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+} (**Figura 59B**, $p < 0.03$). El análisis mediante inmunofluorescencia doble LT β -R/F4/80 demostró una expresión del receptor en los macrófagos de la lesión en ambos genotipos (**imágenes en 59C**).

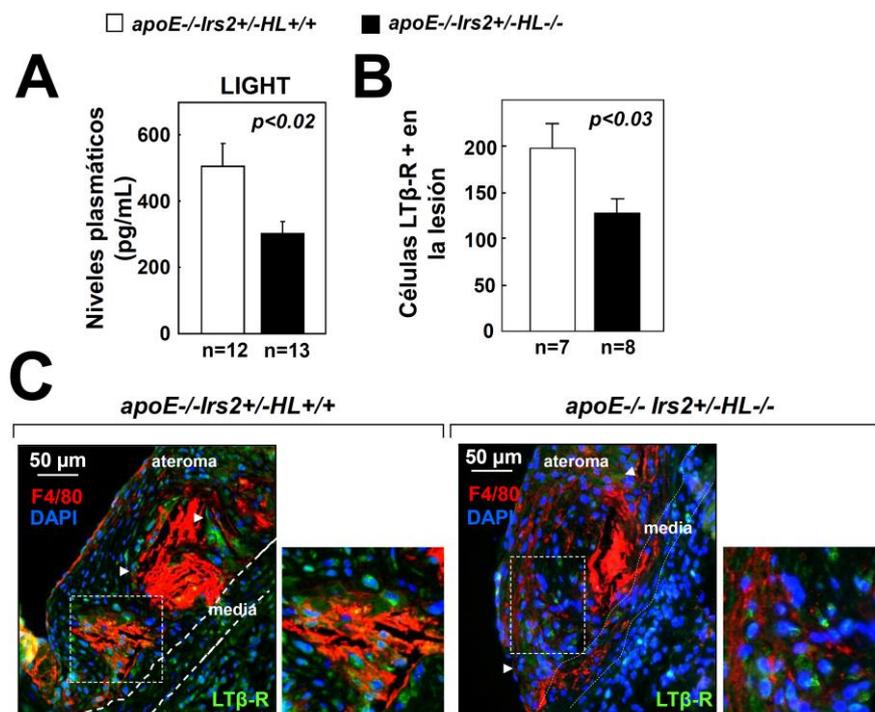


Figura 59. Expresión del eje inflamatorio LIGHT(TNFSF14)/LT β -R en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} tras 2 meses de tratamiento con dieta AGAC. (A) Niveles circulantes en plasma de LIGHT y (B) análisis cuantitativo de las células LT β -R positivas en las lesiones. (C) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia doble con LT β -R/F4/80 identificando como macrófagos que expresan LT β -R. Las líneas punteadas delimitan la zona media de la pared del vaso. A la derecha de las imágenes se muestran detalles a mayor escala de las inmunofluorescencias. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

El análisis en el cayado aórtico, un lecho vascular altamente aterogénico, de los niveles de expresión del ARNm de *Light* y *Lt β -r* demostró niveles inferiores en los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} comparado con los controles *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+} (**Figura**

60, $p < 0.007$ y $p < 0.02$, respectivamente). Consistente con una disminución del infiltrado de leucocitos, los niveles de expresión del ARNm de *Mcp1* y *Tnfa* también fueron significativamente inferiores en el tejido aórtico en los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} (Figura 60A, $p < 0.02$ y $p < 0.03$, respectivamente). Estos resultados *in vivo* indican que una reducción en el tamaño de la lesión en los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} está asociada con una disminución en la activación del eje inflamatorio LIGHT/LT β -R y de la inflamación local en la lesión ateromatosa.

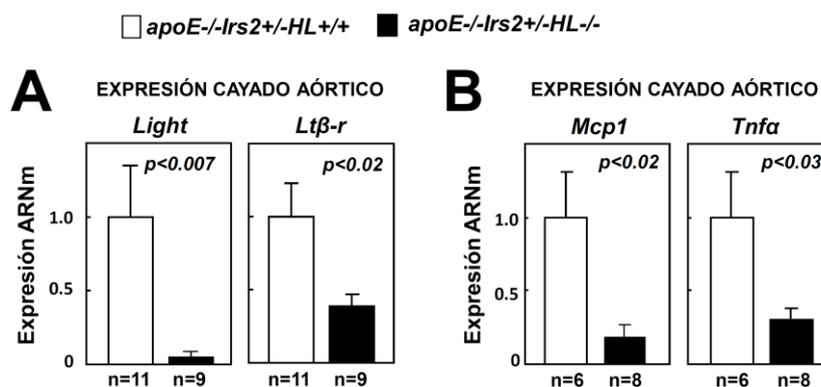


Figura 60. Expresión de mediadores inflamatorios en el cayado aórtico de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/-} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} tras 2 meses de dieta AGAC. Niveles de ARNm de (A) *Light* y *Ltβ-r*, y (B) *Mcp1* y *Tnfa* en el tejido aórtico de los dos grupos de ratones. Los niveles de ARNm se muestran normalizados a los niveles de expresión del ARNm del gen endógeno *ciclofilina* y relativizados a los niveles de ARNm de los ratones control *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/-}. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.2.5. La disminución del tamaño de la lesión en los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} está causada por una reducción en la tasa proliferativa de macrófagos

Dado que la proliferación de los macrófagos en las lesiones es un evento clave en la progresión de la lesión ateromatosa y es altamente dependiente del entorno inflamatorio, se investigó la proliferación de los macrófagos en la lesión. El análisis *in vivo* de las lesiones reveló una disminución del contenido de macrófagos proliferantes, doble positivos Ki67+/F4/80+, en las lesiones de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} comparado con el observado en las lesiones de los controles *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/-} (Figura 61, $p < 0.04$).

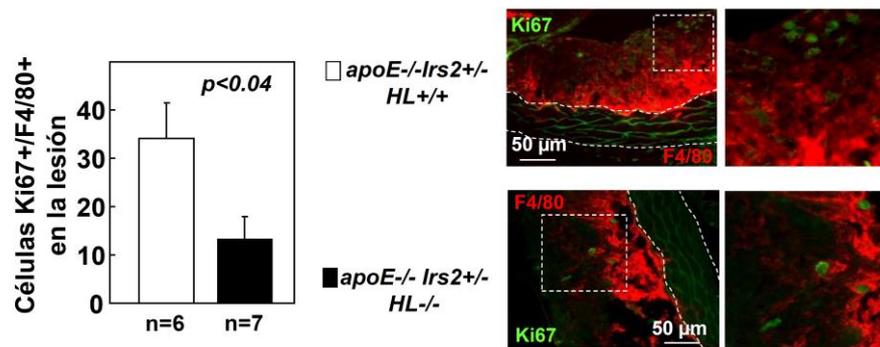


Figura 61. Tasa de proliferación en secciones de aorta de ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+} y *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} tras 2 meses a dieta AGAC. Proliferación de macrófagos en las lesiones, expresada como el número de células doble positivas Ki67/F4/80. Las líneas punteadas delimitan la zona media de la pared del vaso. A la derecha de las imágenes se muestran detalles a mayor escala de las inmunofluorescencias. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

Consistente con estos resultados, los MDMO de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} exhibieron una reducción en la tasa proliferativa *in vitro* en comparación con la de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+} (**Figura 62A**, $p < 0.003$). De acuerdo con una disminución en la proliferación, los niveles de ARNm del gen *p15^{Ink4b}*, con acción citostática debido a la inhibición de la kinasa dependiente de ciclina CDK4/6, fueron mayores en los macrófagos de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} (**Figura 62B**, $p < 0.04$). No se encontraron cambios en el otro inhibidor del ciclo celular *p16^{Ink4a}*. La capacidad de migración, medida en ensayos de cicatrización de herida, también mostraron menor capacidad de migración en los macrófagos de los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-}, demostrado por una mayor área de la herida tras 24 horas de migración, comparado con la que mostraron los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{+/+} (**Figura 62C**, $p < 0.03$).

Estos resultados demuestran una menor proliferación en las lesiones con deficiencia de la HL y una disminución en la capacidad proliferativa e invasiva de los macrófagos deficientes en HL lo que podría explicar la disminución del contenido de macrófagos en la lesión y por lo tanto del tamaño de ésta.

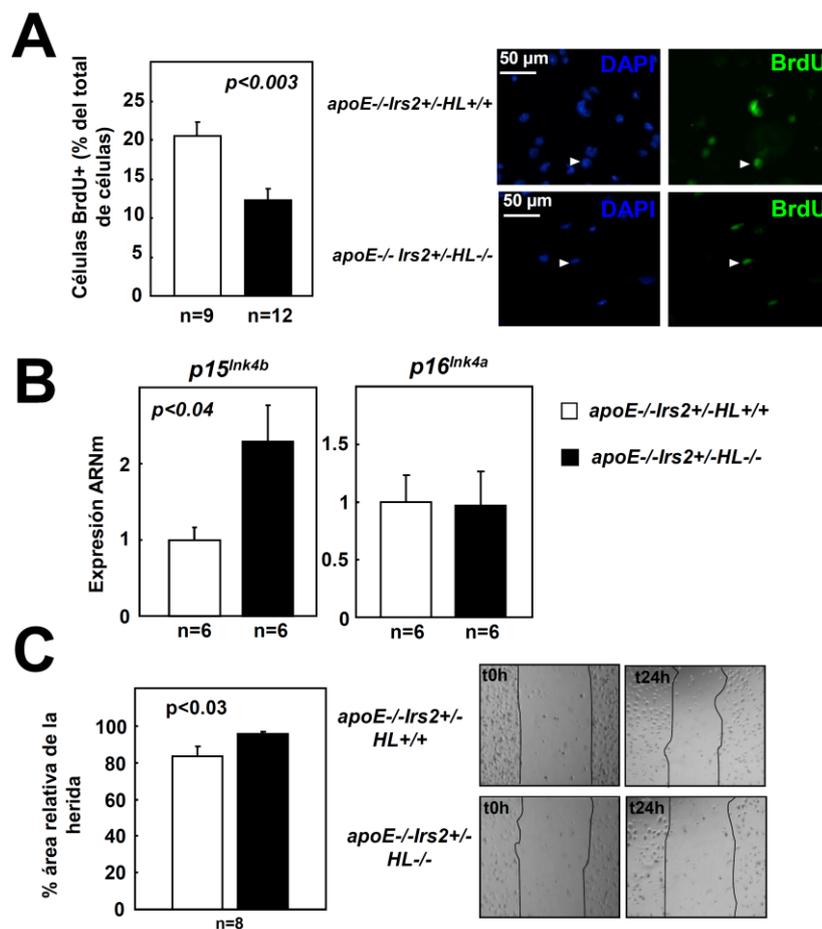


Figura 62. Análisis *in vitro* de la proliferación y de la migración de MDMO en los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL+/+* y *apoE-/-Irs2+/-HL-/-*. (A) Porcentaje de proliferación de los MDMO analizados por la incorporación de BrdU *in vitro* y detectados por inmunofluorescencia. Las flechas blancas indican las células BrdU+. (B) Expresión del ARNm de los genes *p15^{Ink4b}* y *p16^{Ink4a}* en ambos grupos de ratones. (C) Cuantificación del área de migración a las 24 horas relativizada al área a tiempo 0. Se muestran imágenes representativas a tiempo 0 horas y 24 horas de migración. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.2.6. El tratamiento con LIGHT aumenta el desarrollo de la lesión y de los monocitos proinflamatorios circulantes Ly6C^{hi} en los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL-/-*

La disminución del tamaño de la lesión y de la inflamación en los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* estuvo acompañada por un descenso en la expresión del eje LIGHT/LT-βR, por lo que se investigó si el tratamiento con LIGHT recombinante murino era capaz de revertir estos parámetros (**Figura 63**) en ratones *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* sometidos a dieta AGAC durante 2 meses. El tratamiento con LIGHT, durante 28 días, aumentó significativamente el tamaño de la lesión en ratones *apoE-/-Irs2+/-HL-/-* comparado

con ratones *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-}/*HL*^{-/-} tratados con vehículo en el análisis *en face* (**Figura 63A**, $p < 0.02$). El análisis de la lesión en la raíz aórtica medido como ratio íntima-media mostró un aumento del tamaño de la placa en ratones *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-}/*HL*^{-/-} tratados con LIGHT comparado con ratones *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-}/*HL*^{-/-} tratados con vehículo (**Figura 63B**, $p < 0.008$).

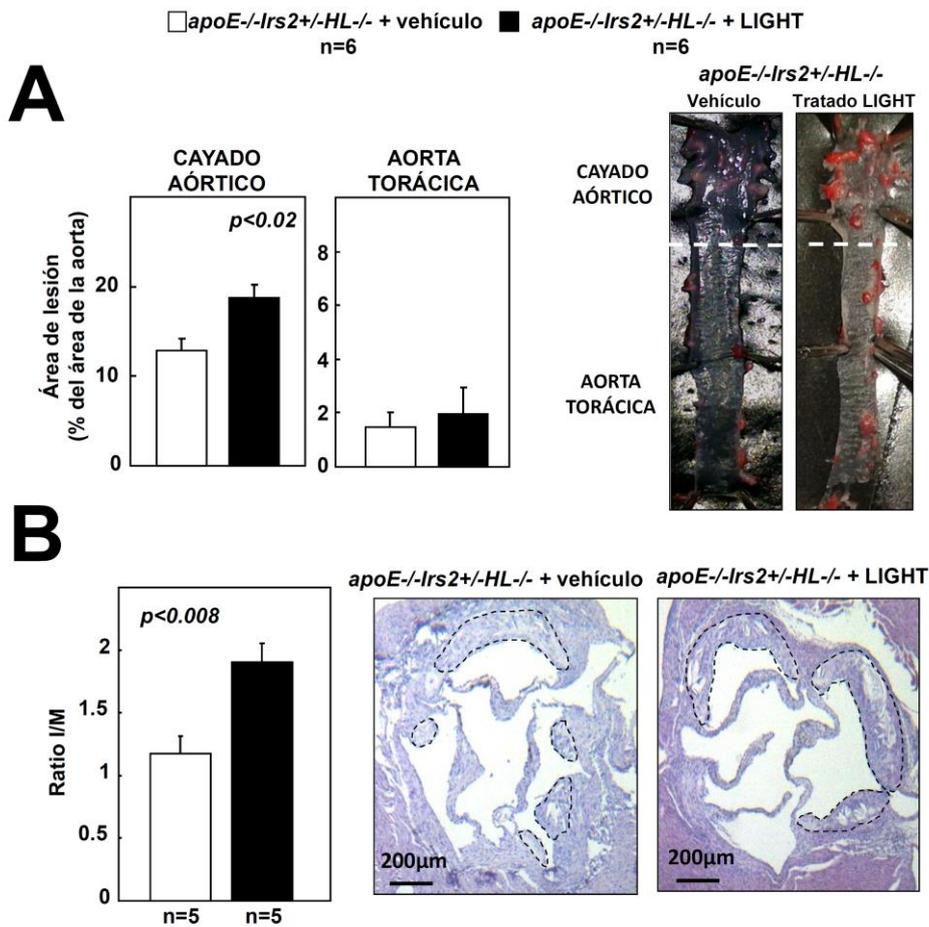


Figura 63. La exposición de los ratones *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-}/*HL*^{-/-} con LIGHT murino recombinante aumenta la aterosclerosis. (A) Análisis *en face* de la aterosclerosis en aortas teñidas con Oil Red O en ratones *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-}/*HL*^{-/-} tratados con LIGHT o con vehículo. (B) Medida del tamaño del ateroma como ratio íntima-media en secciones de aorta. Se muestran imágenes representativas de las aortas y tinciones. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

La caracterización de la placa ateromatosa mostró un ligero aumento, aunque sin diferencias significativas, en el contenido de macrófagos en ratones *apoE*^{-/-}/*Irs2*^{+/-}/*HL*^{-/-} tratados con LIGHT (**Figura 64A**). El análisis de las células T mostró un mayor

contenido de éstas en lesiones de ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} tratados con LIGHT comparado con ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} tratados con vehículo (**Figura 64B**, $p < 0.03$)

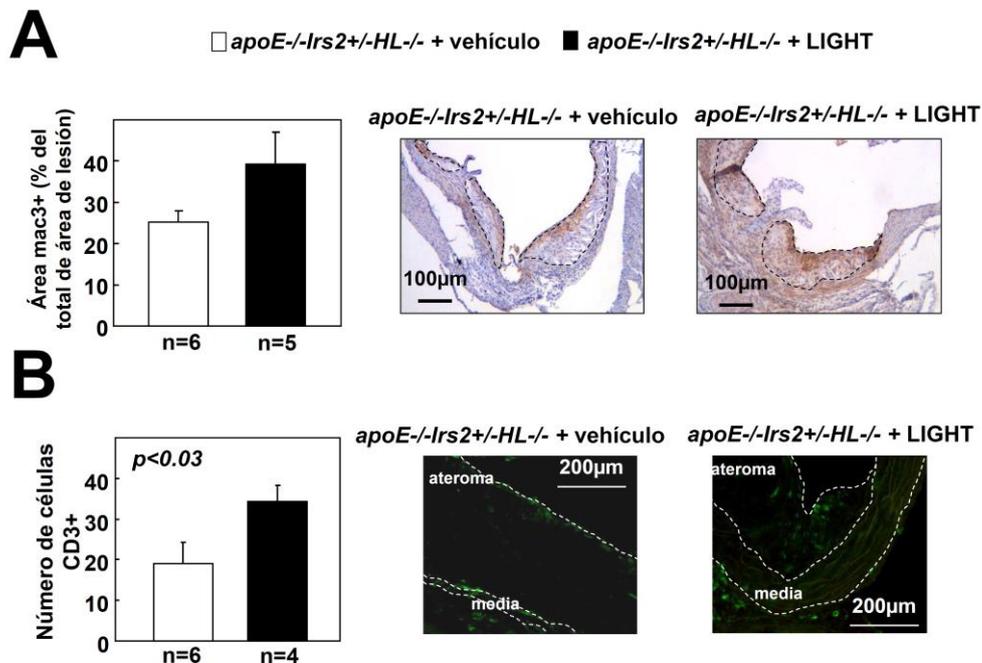


Figura 64. Caracterización de la lesión en secciones de aorta en los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} con dieta AGAC en vehículos y tratados con LIGHT durante 28 días. (A) Contenido de macrófagos en la lesión (porcentaje) y (B) células T (número de células) usando anticuerpos específicos (Mac-3 y CD3, respectivamente). Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica y de la inmunofluorescencia. Las líneas discontinuas delimitan la media y la lesión. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

El análisis por citometría también reveló un aumento en la población de monocitos Ly6C^{hi} proinflamatorios circulantes (**Figura 65A**, $p < 0.007$) y de las células T CD3⁺ en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} tratados con LIGHT comparado con con ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} tratados con vehículo (**Figura 65B**, $p < 0.03$). No se observaron cambios en las células CD4⁺ ni CD8⁺ (**Figura 65C**). Estos estudios demuestran que LIGHT aumenta *in vivo* la población de monocitos Ly6C^{hi} circulantes y el desarrollo de la lesión de ateroma.

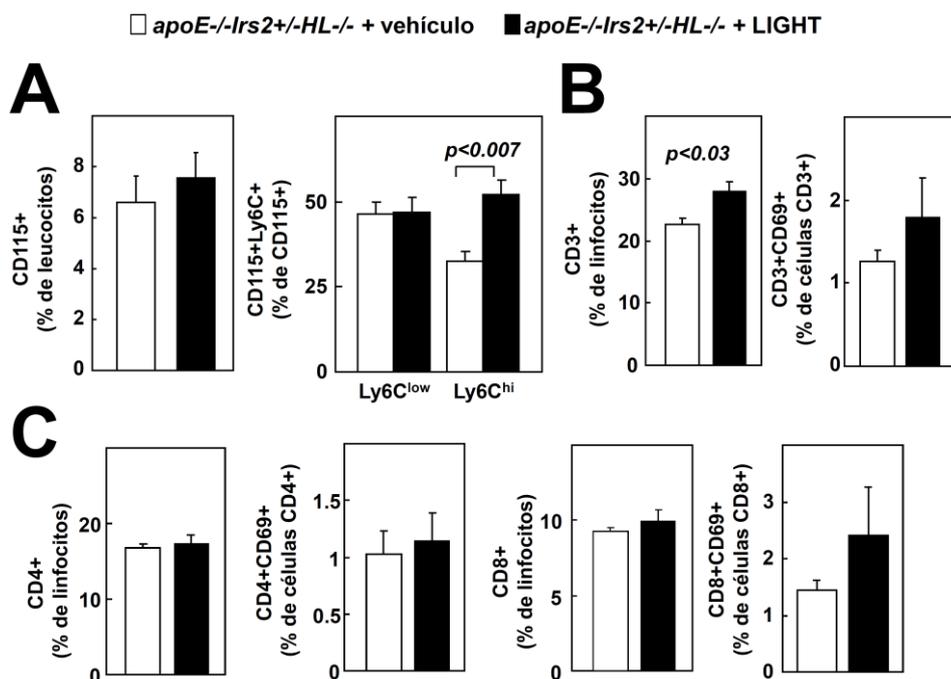


Figura 65. Efecto del tratamiento con LIGHT en los leucocitos circulantes en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-}. (A) Monocitos circulantes totales identificados como células CD115+ y las subpoblaciones de monocitos Ly6C^{hi} y Ly6C^{low} en ambos grupos de ratones. (B) Linfocitos T CD3+ y activados CD3+CD69+ y (C) las subpoblaciones CD4 y CD8 totales y activadas identificadas como CD4+, CD8+, CD4+CD69+ y CD8+CD69+ respectivamente. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.2.7. El tratamiento con LIGHT no afecta a los niveles de lípidos circulantes en ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-}

Estudios previos indican un papel relevante de LIGHT en la modulación de lípidos, por lo que se analizaron los niveles circulantes en plasma de colesterol y triglicéridos en los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} tratados con la citoquina. El análisis demostró que el tratamiento con LIGHT en los ratones *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}*HL*^{-/-} no produjo cambios en el colesterol-apoB, en el colesterol-HDL o en los triglicéridos (**Figura 66**). Por lo tanto, los efectos de LIGHT *in vivo* no están mediados por cambios en los lípidos.

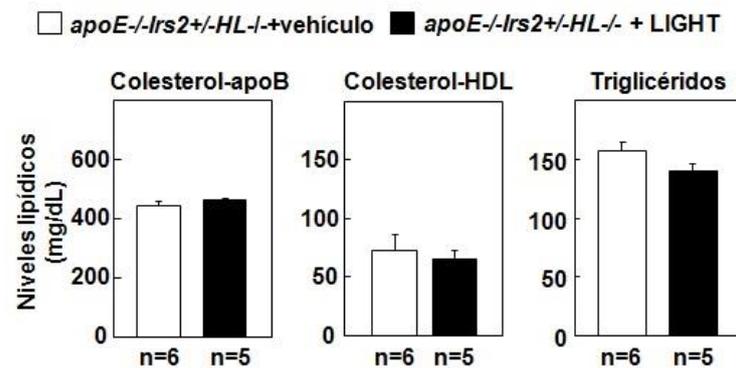


Figura 66. Efecto del tratamiento con LIGHT sobre los niveles de lípidos en los ratones *apoE-/-Irs2+/-HL-/-*. Niveles plasmáticos de colesterol-apoB, colesterol-HDL y triglicéridos en ratones alimentados con dieta AGAC durante 2 meses, tratados con LIGHT o sin tratar durante 28 días. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student.

2.2.8. Efecto de LIGHT sobre los macrófagos tras la inactivación de la HL

Para entender mejor la conexión entre LIGHT y la HL y su papel sobre los macrófagos se llevaron a cabo experimentos con macrófagos murinos y humanos. Consistente con el aumento de los monocitos inflamatorios Ly6C^{hi} tras el tratamiento con LIGHT, éste produjo un aumento de los niveles de ARNm de *Tnfa*, sin cambios en la expresión de *Mcp1*, en MDMO de ratones *apoE-/-* comparado con MDMO tratados con vehículo (**Figura 67A**, $p < 0.05$). El tratamiento de MDMO de ratones *apoE-/-* con LIGHT también produjo un aumento significativo en los niveles de ARNm y proteicos de HL comparado con MDMO de ratones tratados con vehículo (**Figure 67B**, $p < 0.03$ y $p < 0.03$). Estos resultados sugieren que la presencia de HL en macrófagos podría favorecer el fenotipo proinflamatorio de éstos inducido por LIGHT.

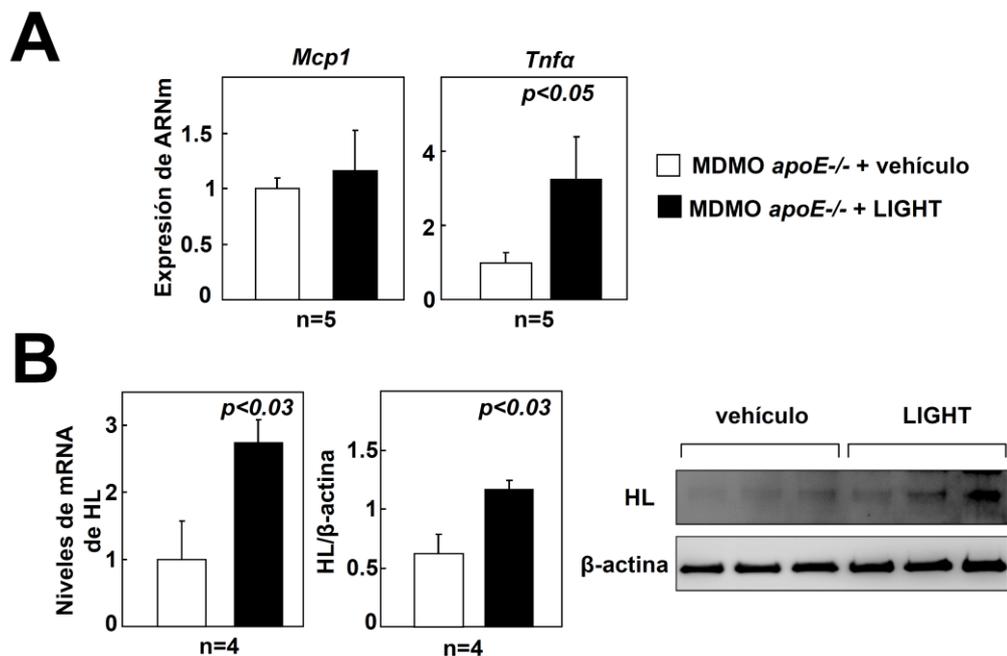


Figura 67. Efecto de LIGHT sobre MDMO procedentes de ratones *apoE*^{-/-}. (A) Análisis de expresión del ARNm de *Mcp1* y *Tnfa* en los MDMO. (B) Análisis de los niveles de ARNm y de proteína de HL en MDMO de ratones *apoE*^{-/-} tratados con vehículo o con LIGHT. Los niveles de ARNm se normalizaron con los niveles del ARNm del gen endógeno *ciclofilina* y relativizados con los niveles de ARNm de los MDMO tratados con vehículo. Los niveles proteicos de HL se muestran normalizados a los niveles proteicos de β-actina. A la derecha de la cuantificación se muestra un blot representativo. El análisis estadístico se realizó mediante el test t-Student.

Consistente con nuestros resultados anteriores, LIGHT incrementó los niveles de expresión del ARNm de las citoquinas *Mcp1* y *Tnfa* (Figura 68A, $p < 0.0003$ y $p < 0.005$). Sin embargo, el tratamiento con LIGHT no produjo cambios significativos en la expresión de las citoquinas en macrófagos con el gen HL silenciado. Por lo que, comparado con macrófagos tratados con siRNA-control, con la HL intacta, los macrófagos siRNA-LIPC mostraron niveles de expresión de *Mcp1* y *Tnfa* significativamente inferiores (Figura 68A, $p < 0.0003$ y $p < 0.008$, respectivamente). Consistente con la disminución de la lesión e inflamación en el ratón deficiente en HL, la inactivación de la HL disminuye la respuesta inflamatoria de los macrófagos inducida por LIGHT.

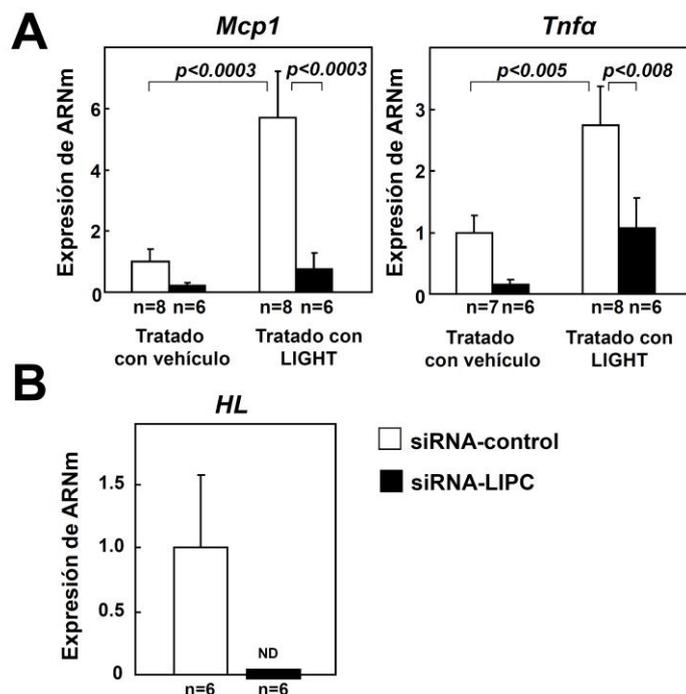


Figura 68. Efecto de LIGHT sobre macrófagos humanos tratados con siRNA-control y siRNA-LIPC. (A) Análisis de expresión de ARNm de *Mcp1* y *Tnfa* en los macrófagos control y tratados con LIGHT, control-siRNA y LIPC-siRNA. Los niveles de ARNm fueron normalizados con los niveles del ARNm del gen endógeno *gapdh* y relativizados a los niveles de ARNm de macrófagos siRNA-Control tratados con vehículo. (B) Niveles de expresión del ARNm de *HL* en macrófagos siRNA-Control y fueron no detectados (ND) en los macrófagos siRNA-LIPC. Los niveles de ARNm se normalizaron con los niveles de ARNm del gen endógeno *gapdh* y relativizados a los niveles de ARNm de macrófagos siRNA-Control. El análisis estadístico se realizó mediante un test One-Way ANOVA (A) y un test t-Student (B).

2.3. Estudios de expresión en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con SMet y SMet-RI

Con el fin de estudiar la relevancia clínica de los resultados obtenidos en el modelo animal *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* sobre el papel de la HL en el desarrollo de la aterosclerosis en estados de SMet y RI, se investigó la expresión de la HL, su relación con la presencia de SMet y de RI y la progresión de la placa de ateroma en sujetos que exhiben estas características. Dado que en el modelo animal con RI hay una asociación entre mayor aterosclerosis y expresión del eje inflamatorio LIGHT(TNFSF14)/LT β -R, se estudió la expresión de esta vía inflamatoria y la activación de células inmunes.

2.3.1. Caracterización demográfica de pacientes con SMet y SMet-RI

Siguiendo los criterios de clasificación detallados en materiales y métodos, los pacientes se clasificaron en dos grupos, SMet y SMet con RI (SMet-RI). Las características demográficas y clínicas de los pacientes se encuentran en la **Tabla 15**. No se encontraron diferencias significativas en la distribución por sexo y edad entre ambos grupos de pacientes. Comparado con los sujetos con SMet, los sujetos con SMet-RI, presentaron un mayor índice de masa corporal, circunferencia de la cintura, índice HOMA-RI y niveles aumentados de glucosa, insulina y triglicéridos en plasma. Los niveles de colesterol HDL fueron menores en los pacientes con SMet-RI. Como era de esperar, la diabetes fue más prevalente en sujetos con SMet-RI y presentaron una mayor frecuencia de medicación hipoglucémica oral y una menor frecuencia en terapia hipolipemiente que los pacientes con SMet sin RI.

Tabla 15. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

	SMet	Smet-RI	p-valor
Género (Hombre/Mujer)	56 (36/20)	65 (35/30)	
Edad (años)	59.1 ± 8.7	56.1 ± 8.6	
Presión arterial Sistólica (mmHg)	138.3 ± 17.2	138.0 ± 16.7	
Presión arterial diastólica (mmHg)	81.6 ± 9.1	85.5 ± 10.4	
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	28.6 ± 4.2	32.4 ± 5.2	<0.001
Medida circunferencia (cm)	94.7 ± 10.6	104.4 ± 13.1	<0.001
Glucosa (mg/dL)	98.6 ± 13.7	124.2 ± 32.0	<0.001
Insulina (mU/L)	8.9 ± 2.7	20.6 ± 9.0	<0.001
Índice HOMA	2.1 ± 0.7	6.3 ± 3.3	<0.001
Colesterol total (mg/dL)	225.8 ± 57.7	231.3 ± 43.8	
Triglicéridos (mg/dL)	147.9 ± 72.6	234.6 ± 162.8	<0.001
Colesterol HDL (mg/dL)	56.1 ± 12.3	47.6 ± 9.1	<0.001
Colesterol LDL (mg/dL)	142.2 ± 49.5	145.6 ± 36.0	
Apo B (mg/dL)	107.4 ± 31.6	112.3 ± 23.2	
Proteína C-reactiva (mg/dL)	2.3 ± 1.9	3.3 ± 2.4	
Fibrinógeno	4.2 ± 0.8	4.2 ± 0.9	
Obesidad (%)	30.4	59.4	
Diabetes (%)	10.7	40	<0.001
Dislipidemia (%)	82.1	81.5	
Hipertensión (%)	61.8	69.5	<0.0001
Medicación:			
Antihipertensivos (%)	48.2	46.2	
Hipolipemiantes (%)	42.9	29.2	<0.007
Hipoglucémicos orales%	8.9	29.2	<0.0001

*Diferencias significativas entre pacientes con SMet y SMet-RI.

2.3.2. La progresión de la aterosclerosis se asociada con un incremento en la expresión de la vía LIGHT/LT β -R y de la HL en pacientes con SMet-RI

Consistente con estudios previos que asocian RI con la aterosclerosis (Kozakova et al., 2013; Martínez-Hervas et al., 2014), el análisis de la arteria carótida humana por ultrasonido reveló un incremento en el GIM-CC en pacientes con SMet-RI en comparación con los pacientes SMet (**Figura 69A**, panel izquierdo, 0.616 vs 0.704, $p < 0.002$). De manera similar, la prevalencia de placas de ateroma fue discretamente mayor, aunque no significativa, en pacientes SMet-RI comparado con sujetos SMet (**Figura 69A**, panel derecho, 35.3% vs 20.8%, $p = 0.07$). Estos resultados muestran que en nuestra cohorte de pacientes la aterosclerosis es mayor en sujetos SMet-RI a pesar de recibir terapias más agresivas.

El análisis de LIGHT circulante en plasma mostró niveles más elevados en sujetos con SMet-RI que en los individuos con SMet (**Figura 69B**, 19.6 vs 29.3, $p < 0.002$). Estudios de expresión también mostraron un incremento en los niveles de ARNm de *Lt β -r* en CMSPs de pacientes con SMet-RI comparado con los sujetos con SMet (**Figura 69B**, $p < 0.05$). El análisis de los monocitos circulantes con los marcadores CD14 y CD16 que distingue entre monocitos clásicos, intermedios y alternativos (Rogacev et al., 2012), demostró un mayor porcentaje de los monocitos intermedios proinflamatorios CD14++CD16+ en pacientes con SMet-RI comparado con los individuos SMet (**Figura 69C**, $p < 0.01$). Por lo tanto, los pacientes con SMet-RI exhiben un incremento en la inflamación.

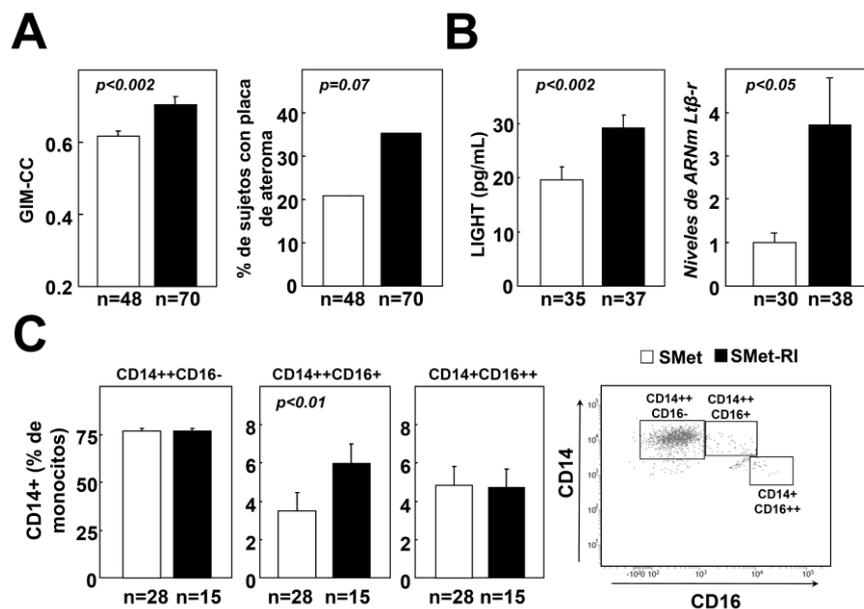


Figura 69. Análisis de la aterosclerosis y de los leucocitos en sujetos con SMet y SMet-RI. (A) Grosor íntima-media de la carótida común (GIM-CC) (panel izquierdo) y prevalencia de placas ateroscleróticas (panel derecho). **(B)** Niveles circulantes en plasma de LIGHT soluble y niveles de expresión de ARNm de *Lfβ-r* en CMSPs en ambos grupos de pacientes. **(C)** Porcentaje de monocitos clásicos CD14++CD16-, intermedios CD14++CD16+ y alternativos CD14+CD16++ en ambos grupos. Los niveles de ARNm se normalizaron con los niveles de *gapdh* y se relativizaron a los niveles de los controles SMet. Se muestra plot representativo de la citometría de flujo. Los datos se muestran como media±error (69A panel izquierdo, B, C) y como porcentaje (69A panel derecho). Los análisis estadísticos se realizaron mediante un test t-Student (69A panel izquierdo, B, C) y test chi-cuadrado (69A panel derecho).

Seguidamente la expresión génica de *HI* fue analizada en CMSPs de ambos grupos de pacientes. El análisis de expresión demostró mayores niveles de ARNm de la *HI* en CMSPs de sujetos con SMet-RI, en comparación con pacientes con SMet (**Figura 70A**, $p < 0.0003$). Curiosamente, los niveles de ARNm de la *HI* de todos los SMet mostraron una correlación positiva con el índice HOMA-RI (**Figura 70B**, $p < 0.04$) indicando que la expresión génica de la *HI* en CMSPs está modulada por la gravedad de la RI.

Estos resultados indican que, en la línea de los resultados obtenidos en el modelo de SMet-RI de ratón, el incremento de la aterosclerosis en los sujetos con SMet-RI está asociado con un aumento de la vía inflamatoria LIGHT/RLT-β, con la expresión génica de *HI* en CMSPs y con un incremento de los monocitos inflamatorios.

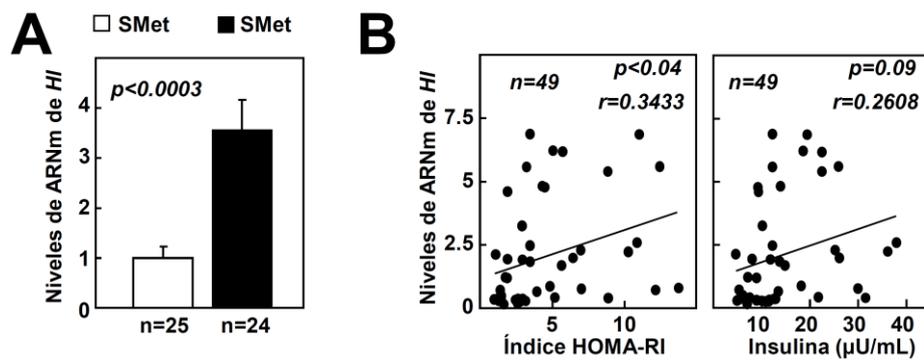


Figura 70. Análisis de la expresión de la HL en leucocitos de sujetos con SMet y SMet-RI. (A) Niveles de expresión del ARNm de *HI* en CMSPs. **(B)** Estudios de correlación entre los niveles de ARNm de *HI* y el índice HOMA-RI e insulina. Los niveles de ARNm se normalizaron con los niveles de *gapdh* y se relativizaron a los niveles de los controles SMet. Los datos se muestran como media \pm error (70A) y como datos individuales para los estudios de correlación (70B). Los análisis estadísticos se realizaron mediante un test t-Student (70A) y mediante el coeficiente de correlación de Spearman (70B).

DISCUSIÓN

OBJETIVO 1. Estudiar el papel del locus *Ink4/Arf* (genes *Cdkn2a/2b*) en el desarrollo de resistencia a la insulina y en la diabetes tipo 2

Variantes génicas en la región cromosómica 9p21, en las cercanías del locus *Ink4/Arf*, se asocian a un mayor riesgo de DMT2 y CAD (Consortium, 2007; Chen et al., 2014; Doria et al., 2008; Hamsten and Eriksson, 2008; Melzer et al., 2007; Saxena et al., 2007; Scott et al., 2007; Sharpless and DePinho, 2007; Zeggini et al., 2007). Por otro lado, estudios previos demuestran que pacientes con RI y SMet tienen reducida la expresión del gen *Irs2* (El Mkadem et al., 2001; Gonzalez-Navarro et al., 2008; Gunton et al., 2005; Stefan et al., 2003; Villuendas et al., 2005).

En los resultados presentados en **la primera parte de este objetivo** se muestra que la haploinsuficiencia para *Irs2* en ratones de un año de edad produce intolerancia a la glucosa y RI y que el aumento de la dosis génica del locus *Ink4/Arf*, en dichos ratones restablece la homeostasis de la glucosa. La mejora en el metabolismo glucémico en los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* se asoció con una reducción en la esteatosis hepática y con una disminución en la inflamación sistémica comparado con los ratones *Irs2+/-*, y todos estos parámetros fueron indistinguibles de los observados en los ratones *WT* de la misma edad. Así, en comparación con los ratones *Irs2+/-*, los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* muestran una reducción en el contenido de triglicéridos, una disminución en la infiltración de macrófagos y una expresión reducida de ARNm de las citoquinas *Tnfa* y *Mcp1*. De manera similar, los niveles circulantes de las citoquinas MCP1 y TNF α , los monocitos proinflamatorios Ly6C^{hi} y la activación de células T, fueron mayores en los ratones *Irs2+/-* comparado con los ratones *WT* e *Irs2+/-SuperInk4/Arf*. Además, macrófagos aislados de los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* exhibieron una disminución en el fenotipo proinflamatorio (menor expresión de *Tnfa*, *Mcp1* y *Il6*). Experimentos de señalización de la insulina *in vivo* mostraron una mejora de la señalización canónica de la insulina dependiente de pAKT/pTyrIRS1 en los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* y una disminución de la activación de la vía de estrés mediada por pSAPK/JNK/pSer307IRS1 en comparación con los ratones *Irs2+/-*. El tratamiento *in vivo* de los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* con la citoquina TNF α aumentó la vía de estrés pSAPK/JNK/pSer307IRS1 y disminuyó la vía canónica de la insulina dependiente de AKT. Por lo que los niveles inferiores de citoquinas inflamatorias en los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* podrían ser, al menos en parte, una de las causas de la mejora en la función hepática, la RI y del restablecimiento de la homeostasis de la glucosa en el ratón *Irs2+/-*.

La relevancia clínica de los hallazgos anteriores, ha sido demostrada en los estudios mostrados **en la segunda parte de este objetivo**. Consistente con los resultados observados en los ratones *Irs2+/-*, las CMSPs de sujetos con DMT2 y DMT2-CAD mostraron niveles reducidos de expresión del ARNm de los genes *Cdkn2a* (*p16^{Ink4a}*), *Cdkn2b* y *Cdkn2bas* y de las proteínas codificadas por el locus, *p16^{Ink4a}* y *p15^{Ink4b}*. El fenotipo leucocitario reveló que la menor expresión de dichos genes en los pacientes con DMT2 y DMT2-CAD estuvo acompañada por un incremento de la activación de las células T, de un aumento de monocitos proinflamatorios y por niveles inferiores de células Treg e IL4. El tratamiento con insulina de linfocitos aislados produjo un aumento en el porcentaje de linfocitos activados y una disminución de los niveles de Treg. Este último resultado junto con la correlación inversa entre Treg y el HOMA-IR y de *Cdkn2b* y el HOMA-IR sugiere que la RI afecta a la expresión de los genes del locus y promueve un fenotipo proinflamatorio. Por lo tanto, estos datos clínicos también indican un papel protector de los genes *Cdkn2a/2b/2bas* en la progresión de la DMT2 y CAD mediante la modulación de las poblaciones de leucocitos.

Estudios previos indican un papel protector de los genes *Cdkn2a/Cdkn2b* en diferentes enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes y aterosclerosis (Chen et al., 2014). Así, un aumento en la expresión del locus *Ink4/Arf* protege contra el envejecimiento en general, proporciona resistencia al cáncer y restablece la sensibilidad a la insulina asociada al envejecimiento en ratones *WT* (Gonzalez-Navarro et al., 2013; Matheu et al., 2009; Matheu et al., 2004). Mientras que la ausencia de *p16^{Ink4a}* o *p19^{Arf}* acelera la aterosclerosis en diferentes modelos de ratón ateroscleróticos (*apoE-/-*, *LDLr-/-*) (Gonzalez-Rodriguez et al., 2010; Kuo et al., 2011).

Los estudios presentados aquí extienden datos previos experimentales que apoyan el papel protector del locus *Ink4/Arf* en síndromes que cursan con RI, DMT2 y CAD. En los resultados obtenidos con pacientes, una expresión reducida de los genes del locus en CMSPs humanas se asocia con el desarrollo de la DMT2 y DMT2-CAD en los que se observó además una correlación inversa de los niveles de ARNm de *Cdkn2b* con el índice HOMA-RI y con el parámetro GIM-CC. Por lo tanto, la expresión de *Cdkn2b* se relaciona directamente con la gravedad de la DMT2 y de la aterosclerosis subclínica.

En el modelo experimental *Irs2+/-*, una copia extra del locus *Ink4/Arf* es suficiente para restaurar la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad y señalización de la insulina, y para disminuir la inflamación y la esteatosis hepática. Ambos estudios en conjunto

indican que los genes *Cdkn2a/2b* desempeñan un papel importante previniendo el desarrollo de la RI, la DMT2 y alteraciones relacionadas como son CAD y la esteatosis hepática. Nuestros resultados están en la línea de investigaciones previas en humanos indicando que variantes genéticas en el gen *Cdkn2b* están asociadas con cambios en el índice HOMA-RI (Ruchat et al., 2009), y con otras investigaciones que vinculan el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos con variantes del gen *Cdkn2bas* (Bochenek et al., 2013). Los resultados obtenidos también están de acuerdo con estudios que vinculan cambios de expresión en *Anril* y *Cdkn2a/2b* con SNPs asociados con ECV (Congrains et al., 2012) y con investigaciones que vinculan una menor expresión de *Cdkn2a* con SNPs de riesgo de aterosclerosis (Liu et al., 2009). Por lo tanto, los resultados presentados aquí proporcionan nuevos datos en humanos y modelos experimentales que apoyan los hallazgos previos que demuestran el papel protector del locus *Ink4/Arf* en enfermedades crónicas como son la esteatosis hepática, la DMT2 y CAD.

Nuestros resultados también indican que el desarrollo de la DMT2 y CAD en humanos cursa con una expresión reducida de los genes *Cdkn2a/2b* y que ésta se asocia con un fenotipo proaterogénico/proinflamatorio de los leucocitos (niveles más bajos de Treg, aumento de células T activadas y disminución de monocitos inflamatorios e IL4) sugiriendo que la modulación de las células inmunes pueden ser un mecanismo potencial. Consistentemente el aumento de la expresión de los genes del locus *Ink4/Arf* disminuye la inflamación sistémica asociada a la RI (Chawla et al., 2011; Nio et al., 2012) y alivia la RI en *Irs2+/-*. En apoyo del supuesto papel antiinflamatorio del locus, los niveles circulantes de monocitos Ly6C^{low}, que están involucrados en la vigilancia y reparación de la función del tejido (Shi and Pamer, 2011), aumentaron en los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf*. Varios estudios previos también apuntan a un papel antiinflamatorio del locus. Así, un incremento en el porcentaje de monocitos Ly6C^{hi} se ha encontrado en ratones con inactivación en el linaje mielóide del gen *Cdkn2a* (Kuo et al., 2011). Por otra parte, la transferencia local de p16^{Ink4a} en las articulaciones de los huesos también suprime la expresión de citoquinas proinflamatorias en un modelo de ratón de artritis reumatoide (Nasu et al., 2000).

Adicionalmente, a nivel celular, los macrófagos de los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* mostraron niveles más bajos en la expresión de *Mcp1*, *Tnfa* y *Il6* y una menor supervivencia (menor proliferación y aumentado de la apoptosis) lo que indica menor

actividad inflamatoria. Por lo que la capacidad antiinflamatoria parece ser una propiedad intrínseca de los macrófagos con una expresión aumentada de *Ink4/Arf*. En la línea de estos resultados se ha descrito que la desregulación de p16^{Ink4a} promueve una polarización de los macrófagos humanos hacia un fenotipo proinflamatorio del tejido adiposo (Fuentes et al., 2011; Kuo et al., 2011), que p16^{Ink4a} en macrófagos humanos interfiere con la señalización de la vía proinflamatoria TLR4–NFκB, (Fuentes et al., 2011) y que p16^{Ink4a} ejerce un efecto antiinflamatorio a través de la degradación acelerada de IRAK1 en macrófagos (Murakami et al., 2012).

Los resultados obtenidos también indican que el fenotipo de los leucocitos cambia y participa en el desarrollo de la RI, DMT2 y CAD y están en la línea de estudios que describen que complicaciones de la aterosclerosis implican a la respuesta inmune (Foks et al., 2015; Taleb et al., 2010; Woollard and Geissmann, 2010). Estudios recientes muestran que el desequilibrio de linfocitos T pro y antiinflamatorios/aterogénicos está asociado con la progresión de la aterosclerosis (Potekhina et al., 2015). También, que el número reducido de células Treg es un mecanismo principal en la presencia y ruptura de la placa vulnerable (George et al., 2012; Mor et al., 2006) y se asocia con un incremento en el riesgo de padecer un infarto de miocardio (Wigren et al., 2012). En ratones, la reducción de células Treg promueve hipercolesterolemia y aterosclerosis (Klingenberg et al., 2013). Los mecanismos ateroprotectores de las células Treg incluyen la inducción de macrófagos antiinflamatorios, supresión de la respuesta inmune de células endoteliales y células linfoides innatas, y promueven la secreción de citoquinas antiinflamatorias (Foks et al., 2015). Consistente con esto, los niveles reducidos de Treg en los sujetos con DMT2 y DMT2-CAD estuvieron acompañados por un incremento de los monocitos proinflamatorios CD14⁺⁺CD16⁺ y por la disminución de los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL4. Por lo que las células T parecen tener un papel clave en el cambio del fenotipo leucocitario asociado a la DMT2 y DMT2-CAD.

Estudios previos muestran que el locus *Ink4/Arf* en los ratones *WT* disminuye la RI asociada al envejecimiento mediante una mejora de la señalización de la insulina dependiente de IRS/AKT (Gonzalez-Navarro et al., 2013). Consistente con esto, los ratones *Irs2*^{+/-}*SuperInk4/Arf* también presentaron una mejora en la vía de señalización mediada por IRS1/AKT comparado con ratones *Irs2*^{+/-} y ésta estuvo acompañada por una disminución de la activación de la vía de estrés inflamatoria SAPK/JNK y por niveles reducidos de la forma inactiva de la proteína IRS1, pSer307IRS1, los cuales

están aumentados en estados inflamatorios (Sabio et al., 2008; Tanti and Jager, 2009). De hecho, la infusión en el ratón *Irs2+/-SuperInk4/Arf* de TNF α , una citoquina que daña la señalización canónica de la insulina e intensifica las vías de estrés (Lee and Lee), incrementó la activación de la vía de estrés pSAPK/JNK/pSer307IRS1 y redujo la señalización de la vía canónica de la insulina mediada por pTyrIRS1/AKT. Aunque la relevancia fisiológica de TNF α no parece estar clara en estudios de pérdida de función del receptor de la citoquina (Schreyer et al., 1998), esta citoquina podría jugar un papel relevante en la disrupción de la señalización de la insulina en los ratones *Irs2+/-*. En conjunto, estos resultados sugieren que una reducción en el fenotipo inflamatorio en los ratones *Irs2+/-SuperInk4/Arf* podría ser, en parte, responsable de la mejora de la RI y de la homeostasis de la glucosa al restablecer la activación mediada por pTyrIRS1/AKT y al reducir la activación de la vía de estrés SAPK/JNK.

Una limitación del estudio en pacientes es que, como era de esperar, los pacientes con DMT2 y DMT2-CAD tienen una mayor frecuencia de medicación hipolipemiente e hipoglucémicos orales que los controles, algunos de los cuales se asocian a una menor inflamación (Escudero et al., 2015; Forero-Pena and Gutierrez, 2013; Saisho, 2015). Sin embargo, a pesar del incremento de medicación en sujetos con DMT2 y DMT2-CAD, éstos exhibieron un fenotipo más inflamatorio. Cabe mencionar, que el cambio en el fenotipo fue más acusado en sujetos con DMT2-CAD, pero las diferencias no fueron significativas. Estos datos indican que un cambio en el fenotipo leucocitario aparece antes de la manifestación del evento agudo y que podría ser un marcador predictivo de futuros eventos cardiovasculares.

En conjunto, nuestros estudios sugieren que el locus *Ink4/Arf* puede proteger del desarrollo de DMT2 y CAD mediante la modulación de las células inmunes. Así en el modelo experimental, ratones *Irs2+/-* de un año de edad, la expresión del locus *Ink4/Arf* atenúa la inflamación sistémica, la esteatosis hepática, y restablece la homeostasis de la glucosa. Estos resultados demuestran un papel protector del locus *Ink4/Arf* frente alteraciones metabólicas, que cursan con RI, esteatosis e inflamación. Por lo que estrategias farmacológicas dirigidas a modular la expresión del locus *Ink4/Arf* o el uso de miméticos del locus *Ink4/Arf* pueden ser una opción terapéutica para restablecer el desajuste del metabolismo de la glucosa y la RI, que cursa con inflamación asociada.

OBJETIVO 2. Estudiar el papel de la lipasa hepática en el metabolismo de carbohidratos, en la esteatosis hepática y en la aterosclerosis diabética

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, del inglés *non-alcoholic fatty liver disease*) está frecuentemente asociada con la presencia de RI hepática y el SMet. De hecho se considera el evento hepático del SMet y existe una relación compleja entre estas tres alteraciones RI, SMet y NAFLD (Gruben et al., 2014; Sabio et al., 2008; Yang et al., 2009). Así, mientras el desarrollo de la RI incrementa la acumulación de triglicéridos en el hígado (Samuel et al., 2010; Samuel and Shulman, 2012), el hígado graso produce un exceso de glucosa y triglicéridos, que son componentes clave en la RI y el SMet (Anstee et al., 2013; Bugianesi et al., 2005; Yki-Jarvinen, 2014)

En el primer estudio de este objetivo demostramos que la deficiencia de la HL, combinada con una dieta rica en grasa y en colesterol, produce en el ratón hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, aumento de los niveles de NEFA e intolerancia a la glucosa. Estas alteraciones metabólicas coincidieron con un aumento en la esteatosis hepática, un incremento de la inflamación sistémica (monocitosis, CD4+Th17+ proinflamatorias y niveles aumentados de MCP1), una mayor infiltración de macrófagos en el hígado y un aumento de la inflamación en el páncreas. El análisis de las vías inflamatorias de estrés mostró niveles elevados de las formas activadas de las quinasas p38 y SAPK/JNK en el ratón *HL*^{-/-}, vías de señalización relacionadas previamente con la esteatosis hepática. Curiosamente, el ratón *HL*^{-/-} alimentado con dieta control mostró intolerancia a la glucosa y dislipidemia, pero no inflamación sistémica ni esteatosis hepática, sugiriendo que los componentes de la dieta juegan un papel importante en la NAFLD y en la inflamación inducida por la deficiencia de HL. En conjunto, estos resultados indican un papel protector de la HL en la enfermedad del hígado graso asociada con una dieta AGAC, restableciendo la funcionalidad hepática y disminuyendo la inflamación.

Estudios previos han mostrado que niveles elevados de ácidos grasos y la hipertrigliceridemia inducida por deficiencias en diversas lipasas, promueven la esteatosis hepática y la progresión de NAFLD. Así, la eliminación de la triglicérido lipasa de tejido adiposo (ATGL) en ratones lleva a una esteatosis severa en el hígado (Ong et al., 2011), y una menor actividad de ATGL en el hígado de pacientes RI también se ha asociado con el desarrollo de NAFLD (Kato et al., 2008). Consistente

con estos resultados, la sobreexpresión de la lipasa sensible a hormona (HSL) o de la ATGL provocan la oxidación de ácidos grasos, mejora la esteatosis hepática y la señalización mediada por insulina en ratones (Reid et al., 2008; Turpin et al., 2011). Por el contrario, la pérdida intracelular de lipasa TGH/Ces3 disminuye la deposición hepática de lípidos, y mejora la tolerancia a la glucosa (Wei et al., 2010). Sorprendentemente, un estudio previo muestra una disminución de la ganancia de peso y reducción de la esteatosis hepática en el ratón deficiente en HL (Chiu et al., 2010). Esta aparentemente discrepancia entre los resultados anteriores y los del presente estudio, podrían estar relacionados con diferentes regímenes dietarios usados en ambas investigaciones. Chiu y colaboradores usaron una dieta obesogénica (21% de grasa y 0.15% de colesterol), que no produjo diferencias en niveles de colesterol ni en ácidos grasos libres mientras que en el estudio presente, la dieta contiene un 10.8% de grasa y 0.75% de colesterol lo que produjo niveles más altos de triglicéridos, NEFA y colesterol. De hecho, en el estudio presente los ratones *HL*^{-/-} alimentados con dieta control no desarrollaron ni esteatosis hepática ni inflamación. Por lo tanto, la combinación de la deficiencia de la HL y la dieta AGAC es la causante de producir la hipertrigliceridemia severa, niveles elevados de NEFA y la esteatosis hepática.

Los ratones *HL*^{-/-} también desarrollaron hipercolesterolemia consistente en niveles de colesterol HDL elevados, hecho que inicialmente podría parecer un mecanismo protector de la progresión de la enfermedad. Sin embargo, aunque terapias dirigidas a elevar el colesterol HDL son efectivas en el tratamiento de dislipidemias (Rayner et al., 2010; Waksman et al., 2010), niveles elevados de colesterol HDL de manera crónica, inducidos por algunas de estas terapias son perjudiciales, como es por ejemplo el caso del silenciamiento a largo plazo con miR-33 en ratones alimentados con dieta alta en grasa que produce hipertrigliceridemia y esteatosis hepática (Goedeke et al., 2014). Todos estos datos sugieren que la inactivación de lipasas que cursan con dislipidemia "tóxica" (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y niveles elevados de ácidos grasos libres) promueve el desarrollo de la esteatosis hepática y NAFLD.

Estudios previos han mostrado que la disminución de la esteatosis hepática, inducida por la sobreexpresión de lipasas (ATGL) (Turpin et al., 2011) o por sobreexpresión de otros genes como el locus *Ink4/Arf* discutido como se describe en el OBJETIVO1, está acompañada por una mejora en la sensibilidad y en la señalización de la insulina (Turpin et al., 2011). La esteatosis hepática en los ratones *HL*^{-/-} cursó

con niveles más altos de glucosa en estados alimentados e intolerancia a la glucosa pero sin cambios en la sensibilidad a la insulina. Dado que los ratones *HL*^{-/-} mostraron una secreción de insulina menor durante el TTG y en el ensayo de secreción de insulina *in vitro*, la célula β podría estar dañada. Así, los ratones *HL*^{-/-} exhibieron un páncreas inflamado que podría afectar a la funcionalidad del mismo. En este sentido, altas concentraciones de ácidos grasos libres, presentes en el plasma de los ratones deficientes en la lipoprotein lipasa (LPL) y en pacientes con hipertrigliceridemia, provocan daños en las células acinares pancreáticas y es un riesgo de desarrollo de pancreatitis aguda (Yang et al., 2009). Curiosamente, un estudio reciente mostró una asociación entre una disminución de la actividad de LPL y HL, hipertrigliceridemia y pancreatitis aguda (Fujita et al., 2010). Todos estos estudios sugieren que la hipertrigliceridemia y el aumento de FFA pueden afectar a la homeostasis de la glucosa mediante la modulación de la sensibilidad a la insulina pero estas alteraciones cuando son inducidas por deficiencias en lipasas también pueden dañar la función pancreática.

Un grado de inflamación bajo es una de las características de la esteatosis hepática avanzada o esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (Gruben et al., 2014; Sabio et al., 2008; Yang et al., 2009). En nuestro estudio el hígado graso en los ratones *HL*^{-/-}, estuvo acompañado por un aumento en la inflamación hepática (contenido en macrófagos y niveles de ARNm de *Mcp1*) y sistémica (MCP1 circulante, monocitosis y mayor porcentaje de células T) caracterizada por un incremento de células T CD4⁺Th17, las cuales han sido asociadas a inflamación crónica (Ramesh et al., 2014). Por lo que estos datos parecen indicar que los ratones *HL*^{-/-} sólo cuando son alimentados con dieta AGAC, desarrollan un estado avanzado de NAFLD. Consistente con nuestros resultados, se ha demostrado que el colesterol procedente de la dieta es necesario para causar inflamación hepática en modelos de ratón hiperlipidémicos (Wouters et al., 2008).

Diferentes características de la progresión de NAFLD, como son el ensanchamiento de los hepatocitos, conducen a la activación de la señalización mediada por las MAPK de estrés y estudios previos han asociado la activación de dichas vías a la progresión de la enfermedad de hígado graso (Sahini and Borlak, 2014). Así, la activación de la vía de la SAPK/JNK ha sido descrita como uno de los principales mecanismos para el desarrollo de esteatohepatitis (Schattenberg et al., 2006; Singh et al., 2009; Tuncman et al., 2006), y la activación de p38 parece

desempeñar un papel relevante en la enfermedad del hígado graso (Menghini et al., 2012; Nio et al., 2012; Song et al., 2014). Por otro lado, se ha demostrado en estudios previos que los NEFA liberados por la HSL activan la vía de las quinasas p38 y SAPK/JNK y que p38 media la expresión de citoquinas proinflamatorias en tejido adiposo (Mottillo et al., 2010). En la línea de estas investigaciones, los ratones *HL*^{-/-} tratados con dieta AGAC exhibieron un aumento en la activación de las vías de señalización de p38 y SAPK/JNK. Así, nuestras investigaciones sugieren que, en presencia de dieta grasa y deficiencia en *HL*, la activación de las vías de estrés de p38 y SAPK/JNK parecen mediar la progresión de la inflamación hepática, el deterioro del metabolismo de la glucosa y la esteatosis.

En resumen, **este primer estudio** demuestra que en la dislipidemia caracterizada por elevados niveles de colesterol y por un aumento de los niveles de NEFA inducida por una dieta AGAC en combinación con la deficiencia de *HL* produce esteatosis hepática/NAFLD, inflamación hepática y pancreática e intolerancia a la glucosa. Dada la ausencia de efecto en la esteatosis hepática/NAFLD en ratones *HL*^{-/-} en dieta control, estos estudios sugieren que la *HL* puede desempeñar un papel protector en situaciones metabólicas que cursan con dislipidemia "tóxica" (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y niveles elevados de ácidos grasos libres) inducida por dieta.

El **segundo estudio de este objetivo** parte de la necesidad médica de reducir el riesgo cardiovascular en pacientes con SMet y RI. A diferencia de lo que hemos observado en el estudio previo sobre la *HL* y la esteatosis hepática, diversas investigaciones apuntan a que la disminución de la *HL* podría ser beneficiosa en entornos metabólicos con SMet y RI. En esta segunda investigación, demostramos que la expresión génica de la *HL* está aumentada en los leucocitos circulantes de los individuos con SMet-RI con mayor aterosclerosis y que la inactivación génica de la *HL* en un modelo de ratón con SMet/RI, *apoE*^{-/-}*Irs2*^{+/-}, reduce marcadamente el desarrollo de la aterosclerosis. Las lesiones ateromatosas en los ratones SMet/RI deficientes en *HL*, también mostraron una disminución del infiltrado inflamatorio y de la proliferación de macrófagos, así como placas más estables (menor área de core necrótico y mayor capa fibrosa).

Por otro lado, las estrategias terapéuticas actuales incluyen la modulación de la inflamación en estados avanzados de aterosclerosis. La *HL*, que modula el metabolismo de las lipoproteínas y de lípidos (Brunzell et al., 2011; Teran-Garcia et al., 2005; Zhang et al., 2006), parece tener un papel también clave en las células

inflamatorias. En nuestro estudio, individuos con SMet-RI además de un aumento en la expresión génica de la *HL* mostraron un aumento en el porcentaje de los monocitos inflamatorios, los cuales son predictores de eventos CV (Rogacev et al., 2012).

Consistentes con estos hallazgos los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* mostraron menor inflamación sistémica con niveles reducidos de monocitos proinflamatorios Ly6C^{hi}, menor activación de los leucocitos T y disminución en los niveles de MCP1, TNF α e IL6. Notablemente, los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* exhibieron una reducción en la activación de la vía LIGHT(TNFSF14)/LT β -R. Interesantemente, el tratamiento de los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* con LIGHT murino incrementó los monocitos Ly6C^{hi} y el tamaño de la lesión indicando un papel de LIGHT en la inflamación y en la progresión de la lesión. Además, en los individuos con SMet-RI con mayor GIM-CC se observó un aumento del eje inflamatorio LIGHT(TNFSF14)/LT β -R, indicando una mayor relevancia clínica de nuestros descubrimientos. En conjunto, estos resultados indican que la inactivación genética de la HL en los ratones con SMet/RI *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* reduce la progresión de la placa de ateroma mediante la disminución de la inflamación lo cual podría potencialmente ser debido a una menor activación del eje inflamatorio LIGHT/LT β -R.

Estudios previos han mostrado que una alta actividad de la HL puede ser perjudicial en la mayoría de los casos con hipertrigliceridemia y dislipidemia asociadas con RI y SMet (Brunzell et al., 2011; Teran-Garcia et al., 2005; Zhang et al., 2006) por lo que niveles más bajos de la actividad de la HL serían deseables en estas patologías. La inactivación de la HL en el modelo animal preclínico con SMet/RI disminuyó *in vivo* la formación de células espumosas, el desarrollo de la aterosclerosis y la inflamación apoyando la hipótesis anterior. En nuestro estudio, pacientes con SMet-RI mostraron mayor aterosclerosis subclínica y mayor porcentaje de monocitos inflamatorios y esto estuvo asociado a un aumento en la expresión del gen *HL*. Además, la expresión de ARNm de la *HL* se correlacionó positivamente con el índice HOMA-RI indicando que el gen de *HL* en leucocitos está aumentado por la RI. Estos resultados son consistentes con investigaciones que muestran que el aumento de la expresión y la actividad de la HL en un modelo de hámster alimentado con fructosa está asociado con RI (Lewis et al., 2004). En la misma línea de estos estudios, en humanos, una reducción en la obesidad abdominal va acompañado de menor actividad de la HL y de una prevención de la DMT2 (Bergeron et al., 2001; Todorova et al., 2004). Por otra parte, la reducción de la grasa abdominal por la actividad física

también modifica el efecto de los polimorfismos de la HL sobre el riesgo de infarto de miocardio en mujeres (Ahmad et al., 2011). En conjunto estas investigaciones sugieren que la inactivación de la HL podría ser beneficiosa en las alteraciones metabólicas donde un fenotipo particular de lipoproteínas crea predisposición a desarrollar un escenario altamente proinflamatorio tal como el inducido por la RI.

La acumulación progresiva de células y mediadores inflamatorios debajo de la capa fibrosa conduce a placas inestables y síndromes clínicos (Dickson and Gotlieb, 2003). Los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* mostraron menor infiltración inflamatoria, menor producción de citoquinas y características de placas estables (Bornfeldt and Tabas, 2011; Martinez-Hervas et al., 2014). La reducción del contenido de colágeno, observada en ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}*, cuya presencia en estados avanzados de las placas proporciona estabilidad, puede probablemente estar indicando la presencia de placas menos avanzadas. Por otra parte, aunque los macrófagos de la lesión pueden eliminar eficazmente los desechos celulares en las lesiones, la acumulación de macrófagos observada en los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{+/+}* parece ser representativa de un proceso crónico inflamatorio no resuelto (Andres et al., 2012; Moore and Tabas, 2011). La proliferación de los macrófagos es un proceso clave en la expansión de la placa, e interesantemente, ésta estuvo significativamente reducida en las lesiones y en macrófagos aislados de los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}*. Por lo tanto, una disminución de la inflamación en el ateroma y en la proliferación de macrófagos, podría ser uno de los principales mecanismos por los cuales la ausencia de la HL mejora la aterosclerosis.

Los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* mostraron una disminución de los niveles circulantes de la citoquina LIGHT y de la expresión de la vía inflamatoria LIGHT/LTβ-R, el cual ha sido asociado con cambios en la expresión de la HL (Chellan et al., 2013; Lo et al., 2007). Cabe señalar, que la disminución en los niveles circulantes de los monocitos proinflamatorios y de las células T activadas es consistente con el papel de LIGHT en la activación y la maduración de los linfocitos T y monocitos (Shaikh et al., 2001; Swirski et al., 2007). En la misma línea, la reducción de los niveles plasmáticos de MCP1, TNFα e IL6 es consistente con estudios que muestran una producción reducida de estas citoquinas en los macrófagos deficientes en LIGHT (Doherty et al., 2011) y con estudios que indican que la sobreexpresión de LIGHT conduce a una inflamación severa (Shaikh et al., 2001). Estos datos sugieren que la aterosclerosis en los ratones con SMet/RI *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{+/+}* podría estar mediada por el incremento

de la activación de la vía inflamatoria LIGHT/LT β -R. Apoyando esta hipótesis, el tratamiento con LIGHT de los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}HL^{-/-}* incrementó significativamente la subpoblación de los monocitos Ly6C^{hi} activados, los linfocitos T y agravó la aterosclerosis. Por otro lado, los individuos con SMet-RI también exhibieron un incremento en los monocitos proinflamatorios CD14⁺⁺CD16⁺, un aumento de la aterosclerosis y una mayor expresión del eje inflamatorio LIGHT/LT β -R. Así, la progresión de la aterosclerosis en estadios de SMet/RI puede estar en parte causado por el incremento de la activación de la vía LIGHT/LT β -R que puede promover la inflamación y la formación de la lesión y la ausencia o disminución de HL podría prevenir dichos procesos. Interesantemente, el tratamiento con LIGHT aumentó el fenotipo inflamatorio de macrófagos humanos y *apoE^{-/-}*, sin embargo el silenciamiento en macrófagos de la HL disminuyó la producción de *Mcp1* y *Tnfa* mediada por LIGHT.

Consistente con un papel de la vía LIGHT/LT β -R en la aterosclerosis, estudios previos han mostrado un incremento de los niveles plasmáticos de LIGHT en pacientes con angina inestable (Scholz et al., 2005) y con altos niveles de LT β -R circulantes en aterosclerosis en humanos (Owens et al., 2010). En la aterosclerosis experimental, sin embargo, se han obtenido resultados discrepantes en ratones que carecen del LT β -R (Grandoch et al., 2015; Hu et al., 2015). En uno de los estudios, la inactivación genética de *Lt β r* en ratones *apoE^{-/-}* disminuyó la aterosclerosis por el aumento de la subpoblación de monocitos Ly6C^{hi} (Grandoch et al., 2015), mientras que en otro estudio los ratones *apoE^{-/-} Lt β r^{-/-}* mostraron una aterosclerosis acelerada y demostraron que la vía CMLV-LT β -R es ateroprotectora al mantener la homeostasis de las células T y los órganos linfoides terciarios aórticos (Hu et al., 2015). Aunque nuestros resultados están de acuerdo con uno de estos estudios (Grandoch et al., 2015) la inactivación del *Lt β r* y el tratamiento agudo con LIGHT no son estrategias equivalentes ya que el LT β -R posee otro ligando, LT β , y LIGHT tiene otro receptor, el HVEM. Estos estudios revelan un papel complejo de la señalización dependiente de LIGHT/LT β -R en la aterosclerosis, la cual podría ejercer efectos divergentes en diferentes tipos celulares (CMLVs vs monocitos/macrófagos) y con resultados variables según la estrategia experimental. Nuestros estudios además son los primeros que demuestran una participación de la vía LIGHT/LT β -R en las complicaciones cardiovasculares en estados de SMetRI tanto en ratones como en humanos.

El aumento de la expresión de la vía LIGHT/LT β -R en los ratones *apoE^{-/-}Irs2^{+/-}* deficientes en HL también se asoció con una disminución en las células espumosas peritoneales. Macrófagos deficientes en la HL muestran una disminución en la captación de LDLox (Nong et al., 2003), y se ha hipotetizado un papel del eje LIGHT/LT β -R en la formación de células espumosas (Scholz et al., 2005). Estos estudios previos sugieren que la HL derivada de los macrófagos podría incrementar la captación de los LDLs modificadas facilitando la captación de lipoproteínas, una hipótesis que no podemos descartar. Por otra parte, el eje LIGHT/LT β -R puede también inducir un fenotipo en los macrófagos incrementando la actividad de los receptores basura o *scavenger* y la formación de células espumosas. Por lo tanto, la disminución de HL y del eje LIGHT/LT β -R podrían contribuir a este proceso.

Los resultados de este estudio demuestran que la HL modula la inflamación y la proliferación de los macrófagos en estadios de SMet/RI y que la inactivación de HL puede ser beneficiosa para reducir el riesgo de ECV en alteraciones metabólicas específicas. Nuestro estudio es el primero que demuestra la participación del eje LIGHT/LT β -R en complicaciones cardiovasculares en SMet/RI tanto en ratones como en humanos. Los datos de humanos presentados aquí también señalan una importante relevancia clínica de nuestros resultados y sugieren que la activación del eje inflamatorio LIGHT/LT β -R podría ser un mecanismo molecular potencialmente implicado en la activación de leucocitos en la aterosclerosis. Por lo que futuros tratamientos basados en la modulación de este eje inflamatorio para moderar la progresión de la aterosclerosis en SMet/RI podrían ser de utilidad terapéutica.

CONCLUSIONES

1. El locus *Ink4/Arf* disminuye la inflamación intrínseca de macrófagos, la inflamación sistémica, la esteatosis hepática y las alteraciones del metabolismo glucémico en ratones *Irs2+/-*, por lo que se le atribuye un papel protector.
2. El aumento de la expresión de *Ink4/Arf* reduce la activación de la vía de estrés SAPK/JNK y mejora la señalización canónica de la insulina mediada por pTyrIRS1/AKT debido, en parte al menos, a la disminución del fenotipo inflamatorio.
3. El desarrollo de DMT2 en pacientes se asocia con una bajada de la expresión de los genes *Cdkn2a/2b/2bas* en células inmunes.
4. La disminución de los genes *Cdkn2a/2b/2bas* en los leucocitos de pacientes con DMT2 y CAD se vincula con el aumento de la activación de linfocitos, con la reducción células Treg circulantes y con un aumento del fenotipo inflamatorio de los monocitos.
5. La deficiencia de la HL en ratones alimentados con dieta AGAC produce un estado avanzado de NAFLD, inflamación pancreática e intolerancia a la glucosa, por lo que se sugieren un papel protector de la HL en el desarrollo de estas alteraciones metabólicas.
6. Dado que los ratones *HL-/-* con dieta control no desarrollan inflamación sistémica ni esteatosis hepática, la dieta AGAC juega un papel principal en el desarrollo del hígado graso asociado a la deficiencia de *HL-/-*.
7. La activación de las vías de estrés de p38 y SAPK/JNK son al menos un mecanismo potencial en la progresión de la inflamación hepática en la esteatosis asociada a la dislipidemia tóxica inducida por dieta y por la deficiencia de HL.
8. La inactivación génica de la HL en los ratones con SMet/RI *apoE-/-Irs2+/-* reduce la progresión de la placa de ateroma mediante una disminución de la inflamación en la placa, de la inflamación sistémica y de la proliferación de los macrófagos.
9. La inactivación génica de la HL va acompañada de una disminución de la activación del eje inflamatorio LIGHT/LT β -R indicando un papel de la vía inflamatoria en la progresión del ateroma.
10. El eje inflamatorio LIGHT/LT β -R promueve la aterosclerosis en estadios de SMet/RI, debido a un aumento en el fenotipo inflamatorio de monocitos/macrófagos y a la activación de linfocitos.

Conclusiones

11. En pacientes, el aumento de la HL en CMSPs se correlaciona con el desarrollo de RI, con la progresión de la aterosclerosis y con la activación de la vía inflamatoria LIGHT/LT β -R.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, T., Chasman, D.I., Buring, J.E., Lee, I.M., Ridker, P.M., and Everett, B.M. (2011). Physical activity modifies the effect of LPL, LIPC, and CETP polymorphisms on HDL-C levels and the risk of myocardial infarction in women of European ancestry. *Circulation* 4, 74-80.

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.

Alexander, C.M., Landsman, P.B., Teutsch, S.M., and Haffner, S.M. (2003). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 52, 1210-1214.

Andres, V., Pello, O.M., and Silvestre-Roig, C. (2012). Macrophage proliferation and apoptosis in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 23, 429-438.

Anstee, Q.M., Targher, G., and Day, C.P. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 330-344.

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., Kushiyama, 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. *Histol Histopathol* 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). A signal for beta-cell failure. *Nature* 391, 846-847.

Bibliografía

Balkwill, F.R., and Burke, F. (1989). The cytokine network. *Immunol Today* 10, 299-304.

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. *Circulation research* 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.

Bergeron, J., Couillard, C., Despres, J.P., Gagnon, J., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., Wilmore, J.H., and Bouchard, C. (2001). Race differences in the response of postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase activities to endurance exercise training in men: results from the HERITAGE Family Study. *Atherosclerosis* 159, 399-406.

Bertomeu, V., Morillas, P., Gonzalez-Juanatey, J.R., Quiles, J., Guindo, J., Soria, F., Llacer, A., Lekuona, I., Mazon, P., Martin-Luengo, C., *et al.* (2008). Prevalence and prognostic influence of peripheral arterial disease in patients ≥ 40 years old admitted into hospital following an acute coronary event. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 36, 189-196.

Biddinger, S.B., and Kahn, C.R. (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol* 68, 123-158.

Birkenfeld, A.L., and Shulman, G.I. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology* 59, 713-723.

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.

Bochenek, G., Hasler, R., El Mokhtari, N.E., Konig, I.R., Loos, B.G., Jepsen, S., Rosenstiel, P., Schreiber, S., and Schaefer, A.S. (2013). The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Hum Mol Genet* 22, 4516-4527.

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- α 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. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Breslow, J.L. (1996). Mouse models of atherosclerosis. *Science (New York, NY)* 272, 685-688.

Brunzell, J.D., Zambon, A., and Deeb, S.S. (2011). The effect of hepatic lipase on coronary artery disease in humans is influenced by the underlying lipoprotein phenotype. *Biochimica et biophysica acta* 1821, 365-372.

Bugianesi, E., McCullough, A.J., and Marchesini, G. (2005). Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 42, 987-1000.

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.

Carr, M.C., and Brunzell, J.D. (2004). Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2601-2607.

Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science (New York, NY)* 332, 1519-1523.

Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223-233.

Bibliografía

Combadiere, C., Raoul, W., Guillonneau, X., and Sennlaub, F. (2003). Comment on "Ccl2, Cx3cr1 and Ccl2/Cx3cr1 chemokine deficiencies are not sufficient to cause age-related retinal degeneration" by Luhmann et al. (*Exp. Eye Res.* 2013; 107: 80.doi: 10.1016). *Experimental eye research* 111, 134-135.

Conget, I. (2002). Diagnosis, Classification and Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Rev Esp Cardiol* 55, 528-535.

Congrains, A., Kamide, K., Oguro, R., Yasuda, O., Miyata, K., Yamamoto, E., Kawai, T., Kusunoki, H., Yamamoto, H., Takeya, Y., et al. (2012). Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis* 220, 449-455.

Consortium, T.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.

Chang L, C.S., Saltiel AR (2004). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 10(7-12):65-71.

Chawla, A., Nguyen, K.D., and Goh, Y.P. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature reviews* 11, 738-749.

Chellan, B., Koroleva, E.P., Sontag, T.J., Tumanov, A.V., Fu, Y.X., Getz, G.S., and Reardon, C.A. (2013). LIGHT/TNFSF14 can regulate hepatic lipase expression by hepatocytes independent of T cells and Kupffer cells. *PLoS One* 8, e54719.

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.

Chen, H.H., Almontashiri, N.A., Antoine, D., and Stewart, A.F. (2014). Functional genomics of the 9p21.3 locus for atherosclerosis: clarity or confusion? *Curr Cardiol Rep* 16, 502.

Chiu, H.K., Qian, K., Ogimoto, K., Morton, G.J., Wisse, B.E., Agrawal, N., McDonald, T.O., Schwartz, M.W., and Dichek, H.L. (2010). Mice lacking hepatic lipase are lean and protected against diet-induced obesity and hepatic steatosis. *Endocrinology* 151, 993-1001.

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.

Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

Debniak, T., Scott, R.J., Huzarski, T., Byrski, T., Rozmiarek, A., Debniak, B., Zaluga, E., Maleszka, R., Kladny, J., Gorski, B., *et al.* (2005). CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res* 65, 835-839.

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.

Dickson, B.C., and Gotlieb, A.I. (2003). Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Pathol* 12, 237-248.

Diffenderfer, M.R., and Schaefer, E.J. (2014). The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr Opin Lipidol* 25, 221-226.

Doherty, T.A., Soroosh, P., Khorram, N., Fukuyama, S., Rosenthal, P., Cho, J.Y., Norris, P.S., Choi, H., Scheu, S., Pfeffer, K., *et al.* (2011). The tumor necrosis factor family member LIGHT is a target for asthmatic airway remodeling. *Nat Med* 17, 596-603.

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.

Dugi, K.A., Brandauer, K., Schmidt, N., Nau, B., Schneider, J.G., Mentz, S., Keiper, T., Schaefer, J.R., Meissner, C., Kather, H., *et al.* (2001). Low hepatic lipase activity is a novel risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 104, 3057-3062.

El Mkaem, S.A., Lautier, C., Macari, F., Molinari, N., Lefebvre, P., Renard, E., Gris, J.C., Cros, G., Daures, J.P., Bringer, J., *et al.* (2001). Role of allelic variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in moderate-to-severe insulin resistance of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 50, 2164-2168.

Escudero, P., Martinez de Marañon, A., Collado, A., Gonzalez-Navarro, H., Hermenegildo, C., Peiro, C., Piqueras, L., and Sanz, M.J. (2015). Combined sub-optimal doses of rosuvastatin and bexarotene impair angiotensin II-induced arterial mononuclear cell adhesion through inhibition of Nox5 signaling pathways and increased RXR/PPARalpha and RXR/PPARgamma interactions. *Antioxidants & redox signaling* 22, 901-920.

Bibliografía

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson,, and 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. *The Journal of clinical investigation* 101, 890-898.

Farese, R.V., Jr., and Walther, T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855-860.

Foks, A.C., Lichtman, A.H., and Kuiper, J. (2015). Treating atherosclerosis with regulatory T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 280-287.

Forero-Pena, D.A., and Gutierrez, F.R. (2013). Statins as modulators of regulatory T-cell biology. *Mediators of inflammation* 2013, 167086.

Freeman, L., Amar, M.J., Shamburek, R., Paigen, B., Brewer, H.B., Jr., Santamarina-Fojo, S., and Gonzalez-Navarro, H. (2007). Lipolytic and ligand-binding functions of hepatic lipase protect against atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* 48, 104-113.

Fuentes, L., Wouters, K., Hannou, S.A., Cudejko, C., Rigamonti, E., Mayi, T.H., Derudas, B., Pattou, F., Chinetti-Gbaguidi, G., Staels, B., *et al.* (2011). Downregulation of the tumour suppressor p16INK4A contributes to the polarisation of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia* 54, 3150-3156.

Fujita, K., Maeda, N., Kozawa, J., Murano, K., Okita, K., Iwahashi, H., Kihara, S., Ishigami, M., Omura, M., Nakamura, T., *et al.* (2010). A case of adolescent hyperlipoproteinemia with xanthoma and acute pancreatitis, associated with decreased activities of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase. *Intern Med* 49, 2467-2472.

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. *Journal of the American College of Cardiology* 46, 937-954.

George, J., Schwartzberg, S., Medvedovsky, D., Jonas, M., Charach, G., Afek, A., and Shamiss, A. (2012). Regulatory T cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques. *Atherosclerosis* 222, 519-523.

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.

Glass, C.K., and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104, 503-516.

Goedeke, L., Salerno, A., Ramirez, C.M., Guo, L., Allen, R.M., Yin, X., Langley, S.R., Esau, C., Wanschel, A., Fisher, E.A., *et al.* (2014). Long-term therapeutic silencing of miR-33 increases circulating triglyceride levels and hepatic lipid accumulation in mice. *EMBO Mol Med* 6, 1133-1141.

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. *Journal of the American College of Cardiology* 55, 2258-2268.

González-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. *The Journal of biological chemistry* 279, 45312-45321.

Gonzalez-Navarro, H., Nong, Z., Freeman, L., Bensadoun, A., Peterson, K., and Santamarina-Fojo, S. (2002). Identification of mouse and human macrophages as a site of synthesis of hepatic lipase. *J Lipid Res* 43, 671-675.

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., Sanz, M.J., Delgado, M., Pozo, M.A., Serrano, M., Burks, D.J., and Andres, V. (2013). Increased dosage of Ink4/Arf protects against glucose intolerance and insulin resistance associated with aging. *Aging Cell* 12-, 102-111.

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.

Bibliografía

Gonzalez-Rodriguez, A., Mas Gutierrez, J.A., Sanz-Gonzalez, S., Ros, M., Burks, D.J., and Valverde, A.M. (2010). Inhibition of PTP1B restores IRS1-mediated hepatic insulin signaling in IRS2-deficient mice. *Diabetes* 59, 588-599.

Grabner, R., Lotzer, K., Dopping, S., Hildner, M., Radke, D., Beer, M., Spanbroek, R., Lippert, B., Reardon, C.A., Getz, G.S., *et al.* (2009). Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J Exp Med* 206, 233-248.

Grandoch, M., Feldmann, K., Gothert, J.R., Dick, L.S., Homann, S., Klatt, C., Bayer, J.K., Waldheim, J.N., Rabausch, B., Nagy, N., *et al.* (2015). Deficiency in lymphotoxin beta receptor protects from atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation research* 116, e57-68.

Gruben, N., Shiri-Sverdlov, R., Koonen, D.P., and Hofker, M.H. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease: A main driver of insulin resistance or a dangerous liaison? *Biochimica et biophysica acta* 1842, 2329-2343.

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. *Journal of Internal Medicine* 263, 538-552.

Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.

Hannou, S.A.W., K. Paumelle, R. Staels, B. (2015). Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs? *Trends in endocrinology and metabolism* 26, 176-184.

Hansson, G.K. (2007). Medicine. LIGHT hits the liver. *Science (New York, NY)* 316, 206-207.

Hime, N.J., Black, A.S., Bulgrien, J.J., and Curtiss, L.K. (2008). Leukocyte-derived hepatic lipase increases HDL and decreases en face aortic atherosclerosis in LDLr-/- mice expressing CETP. *J Lipid Res* 49, 2113-2123.

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.

Hu, D., Mohanta, S.K., Yin, C., Peng, L., Ma, Z., Srikakulapu, P., Grassia, G., MacRitchie, N., Dever, G., Gordon, P., *et al.* (2015). Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Aorta Immunity and Protect against Atherosclerosis via Vascular Smooth Muscle Cell Lymphotoxin beta Receptors. *Immunity* 42, 1100-1115.

Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggiori, F., and Schneiter, R. (2011). Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 124, 2424-2437.

Jaipersad, A.S., Lip, G.Y., Silverman, S., and Shantsila, E. (2014). The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 63, 1-11.

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 (New York, NY)* 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? *Circulation research* 100, 769-781.

Kato, M., Higuchi, N., and Enjoji, M. (2008). Reduced hepatic expression of adipose tissue triglyceride lipase and CGI-58 may contribute to the development of non-alcoholic fatty liver disease in patients with insulin resistance. *Scand J Gastroenterol* 43, 1018-1019.

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. *The Journal of clinical investigation* 105, 199-205.

Bibliografía

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. *The Journal of biological chemistry* 273, 34543-34550.

Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127, 265-275.

Klingenberg, R., Gerdes, N., Badeau, R.M., Gistera, A., Strodthoff, D., Ketelhuth, D.F., Lundberg, A.M., Rudling, M., Nilsson, S.K., Olivecrona, G., *et al.* (2013). Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 123, 1323-1334.

Koenen, R.R., and Weber, C. (2011). Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis. *EMBO Mol Med* 3, 713-725.

Kon, N., Zhong, J., Qiang, L., Accili, D., and Gu, W. (2012). Inactivation of arf-bp1 induces p53 activation and diabetic phenotypes in mice. *The Journal of biological chemistry* 287, 5102-5111.

Kozakova, M., Natali, A., Dekker, J., Beck-Nielsen, H., Laakso, M., Nilsson, P., Balkau, B., and Ferrannini, E. (2013). Insulin sensitivity and carotid intima-media thickness: relationship between insulin sensitivity and cardiovascular risk study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 1409-1417.

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. *The Journal of clinical investigation* 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.

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.

Lee, B.C., and Lee, J. (2014). Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1842, 446-462.

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.

Lewis, G.F., Murdoch, S., Uffelman, K., Naples, M., Szeto, L., Albers, A., Adeli, K., and Brunzell, J.D. (2004). Hepatic lipase mRNA, protein, and plasma enzyme activity is increased in the insulin-resistant, fructose-fed Syrian golden hamster and is partially normalized by the insulin sensitizer rosiglitazone. *Diabetes* 53, 2893-2900.

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*.

Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*.

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.

Bibliografía

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* (San Diego, Calif 25, 402-408.

Lo, J.C., Wang, Y., Tumanov, A.V., Bamji, M., Yao, Z., Reardon, C.A., Getz, G.S., and Fu, Y.X. (2007). Lymphotoxin beta receptor-dependent control of lipid homeostasis. *Science* (New York, NY 316, 285-288.

Lopez-Rios, L., Novoa, F.J., Chirino, R., Varillas, F., Boronat-Cortes, M., and Wagner, A.M. (2011). Interaction between cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase encoding genes and the risk of type 2 diabetes: results from the Telde study. *PLoS One* 6, e27208.

Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.

Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* (New York, NY 240, 622-630.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686.

Marchesini, G., and Marzocchi, R. (2007). Metabolic syndrome and NASH. *Clin Liver Dis* 11, 105-117, ix.

Martinez-Hervas, S., Argente, C., Garcia-Jodar, J., Priego, A., Real, J.T., Carratala, A., Carmena, R., and Ascaso, J.F. (2011). Misclassification of subjects with insulin resistance and associated cardiovascular risk factors by homeostasis model assessment index. Utility of a postprandial method based on oral glucose tolerance test. *Metabolism* 60, 740-746.

Martinez-Hervas, S., Vinue, A., Nunez, L., Andres-Blasco, I., Piqueras, L., Real, J.T., Ascaso, J.F., Burks, D.J., Sanz, M.J., and Gonzalez-Navarro, H. (2014). Insulin resistance aggravates atherosclerosis by reducing vascular smooth muscle cell survival and increasing CX3CL1/CX3CR1 axis. *Cardiovasc Res* 103, 324-336.

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., 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.

Mauri, D.N., Ebner, R., Montgomery, R.I., Kochel, K.D., Cheung, T.C., Yu, G.L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., *et al.* (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 8, 21-30.

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.

Menghini, R., Casagrande, V., Menini, S., Marino, A., Marzano, V., Hribal, M.L., Gentileschi, P., Lauro, D., Schillaci, O., Pugliese, G., *et al.* (2012). TIMP3 overexpression in macrophages protects from insulin resistance, adipose inflammation, and nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Diabetes* 61, 454-462.

Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196, 430-443.

Mitsutake, S., Zama, K., Yokota, H., Yoshida, T., Tanaka, M., Mitsui, M., Ikawa, M., Okabe, M., Tanaka, Y., Yamashita, T., *et al.* (2011). Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *The Journal of biological chemistry* 286, 28544-28555.

Mizel, S.B., and Farrar, J.J. (1979). Revised nomenclature for antigen-nonspecific T-cell proliferation and helper factors. *Cell Immunol* 48, 433-436.

Montalescot, G., Sechtem, U., Achenbach, S., Andreotti, F., Arden, C., Budaj, A., Bugiardini, R., Crea, F., Cuisset, T., Di Mario, C., *et al.* (2013). ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *European heart journal* 34, 2949-3003.

Moore, K.J., Sheedy, F.J., and Fisher, E.A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature reviews* 13, 709-721.

Bibliografía

Moore, K.J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341-355.

Mor, A., Luboshits, G., Planer, D., Keren, G., and George, J. (2006). Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes. *European heart journal* 27, 2530-2537.

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.

Mottillo, E.P., Shen, X.J., and Granneman, J.G. (2010). beta3-adrenergic receptor induction of adipocyte inflammation requires lipolytic activation of stress kinases p38 and JNK. *Biochimica et biophysica acta* 1801, 1048-1055.

Murakami, Y., Mizoguchi, F., Saito, T., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. (2012). p16(INK4a) exerts an anti-inflammatory effect through accelerated IRAK1 degradation in macrophages. *J Immunol* 189, 5066-5072.

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.

Nasu, K., Kohsaka, H., Nonomura, Y., Terada, Y., Ito, H., Hirokawa, K., and Miyasaka, N. (2000). Adenoviral transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor genes suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 165, 7246-7252.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852.

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., and 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. *The Journal of clinical investigation*.

Nio, Y., Yamauchi, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Funata, M., Yamaguchi, M., Ueki, K., and Kadowaki, T. (2012). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) deficiency enhances alternatively activated M2 macrophages and ameliorates insulin resistance and fatty liver in lipoatrophic diabetic A-ZIP transgenic mice. *Diabetologia* 55, 3350-3358.

Nong, Z., Gonzalez-Navarro, H., Amar, M., Freeman, L., Knapper, C., Neufeld, E.B., Paigen, B.J., Hoyt, R.F., Fruchart-Najib, J., and Santamarina-Fojo, S. (2003). Hepatic lipase expression in macrophages contributes to atherosclerosis in apoE-deficient and LCAT-transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 112, 367-378.

Norris, A.W., Chen, L., Fisher, S.J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A.C., Hirshman, M.F., Rosen, E.D., Goodyear, L.J., Gonzalez, F.J., *et al.* (2003). Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *The Journal of clinical investigation* 112, 608-618.

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.

Ong, K.T., Mashek, M.T., Bu, S.Y., Greenberg, A.S., and Mashek, D.G. (2011). Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. *Hepatology* 53, 116-126.

Otterdal, K., Haukeland, J.W., Yndestad, A., Dahl, T.B., Holm, S., Segers, F.M., Gladhaug, I.P., Konopski, Z., Damas, J.K., Halvorsen, B., *et al.* (2015). Increased Serum Levels of LIGHT/TNFSF14 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Possible Role in Hepatic Inflammation. *Clin Transl Gastroenterol* 6, e95.

Owens, A.W., Matulevicius, S., Rohatgi, A., Ayers, C.R., Das, S.R., Khera, A., McGuire, D.K., and de Lemos, J.A. (2010). Circulating lymphotoxin beta receptor and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study. *Atherosclerosis* 212, 601-606.

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.

Bibliografía

Palmer, I., and Wingfield, P.T. (2004). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current protocols in protein science /* editorial board, John E Coligan [et al] *Chapter 6, Unit 6 3*.

Pasmant, E., Sabbagh, A., Vidaud, M., and Bieche, I. (2010). ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *Faseb J* 25, 444-448.

Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hageman, 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.

Pol, A., Gross, S.P., and Parton, R.G. (2014). Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *The Journal of cell biology* 204, 635-646.

Potekhina, A.V., Pylaeva, E., Provatorov, S., Ruleva, N., Masenko, V., Noeva, E., Krasnikova, T., and Arefieva, T. (2015). Treg/Th17 balance in stable CAD patients with different stages of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 238, 17-21.

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.

Ramesh, R., Kozhaya, L., McKeivitt, K., Djuretic, I.M., Carlson, T.J., Quintero, M.A., McCauley, J.L., Abreu, M.T., Unutmaz, D., and Sundrud, M.S. (2014). Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med* 211, 89-104.

Rayner, K.J., Suarez, Y., Davalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M.L., Tamehiro, N., Fisher, E.A., Moore, K.J., and Fernandez-Hernando, C. (2010). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science (New York, NY)* 328, 1570-1573.

Reid, B.N., Ables, G.P., Otlivanchik, O.A., Schoiswohl, G., Zechner, R., Blaner, W.S., Goldberg, I.J., Schwabe, R.F., Chua, S.C., Jr., and Huang, L.S. (2008). Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *The Journal of biological chemistry* 283, 13087-13099.

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.

Rhodes, C.J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* (New York, NY 307, 380-384.

Rogacev, K.S., Cremers, B., Zawada, A.M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Grosse-Dunker, G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., *et al.* (2012). CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *Journal of the American College of Cardiology* 60, 1512-1520.

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.

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 Diabetol* 46, 217-226.

Bibliografía

Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., and Davis, R.J. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science (New York, NY)* 322, 1539-1543.

Sabio, G., and Davis, R.J. (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in immunology* 26, 237-245.

Sahini, N., and Borlak, J. (2014). Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes. *Prog Lipid Res* 54, 86-112.

Saisho, Y. (2015). Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 15, 196-205.

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.

Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375, 2267-2277.

Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852-871.

Santamarina-Fojo, S., Gonzalez-Navarro, H., Freeman, L., Wagner, E., and Nong, Z. (2004). Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1750-1754.

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.

Sata, M., and Walsh, K. (1998). Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *The Journal of clinical investigation*.

Satyanarayana, A., and Rudolph, K.L. (2004). p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age. *The Journal of clinical investigation* 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* (New York, NY) **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* (New York, NY) **316**, 1341-1345.

Schattenberg, J.M., Singh, R., Wang, Y., Lefkowitz, J.H., Rigoli, R.M., Scherer, P.E., and Czaja, M.J. (2006). JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* **43**, 163-172.

Schmidt, A.M., and Stern, D. (2000). Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Curr Atheroscler Rep* **2**, 430-436.

Scholz, H., Sandberg, W., Damas, J.K., Smith, C., Andreassen, A.K., Gullestad, L., Froland, S.S., Yndestad, A., Aukrust, P., and Halvorsen, B. (2005). Enhanced plasma levels of LIGHT in unstable angina: possible pathogenic role in foam cell formation and thrombosis. *Circulation* **112**, 2121-2129.

Schreyer, S.A., Chua, S.C., Jr., and LeBoeuf, R.C. (1998). Obesity and diabetes in TNF-alpha receptor- deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **102**, 402-411.

Semenkovich, C.F. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* **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.

Shaikh, R.B., Santee, S., Granger, S.W., Butrovich, K., Cheung, T., Kronenberg, M., Cheroutre, H., and Ware, C.F. (2001). Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction. *J Immunol* **167**, 6330-6337.

Bibliografía

Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 703-713.

Sherr, C.J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60, 3689-3695.

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.

Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews* 11, 762-774.

Singh, R., Wang, Y., Xiang, Y., Tanaka, K.E., Gaarde, W.A., and Czaja, M.J. (2009). Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology* 49, 87-96.

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.

Song, Y., Li, X., Li, Y., Li, N., Shi, X., Ding, H., Zhang, Y., Li, X., Liu, G., and Wang, Z. (2014). Non-esterified fatty acids activate the ROS-p38-p53/Nrf2 signaling pathway to induce bovine hepatocyte apoptosis in vitro. *Apoptosis* 19, 984-997.

Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., and 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.

Stefan, N., Kovacs, P., Stumvoll, M., Hanson, R.L., Lehn-Stefan, A., Permana, P.A., Baier, L.J., Tataranni, P.A., Silver, K., and Bogardus, C. (2003). Metabolic effects of the Gly1057Asp polymorphism in IRS-2 and interactions with obesity. *Diabetes* 52, 1544-1550.

Stolar, M.W., and Chilton, R.J. (2003). Type 2 diabetes, cardiovascular risk, and the link to insulin resistance. *Clin Ther* 25 *Suppl B*, B4-31.

Swirski, F.K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F.W., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated

monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *The Journal of clinical investigation* 117, 195-205.

Tabas, I. (2009). Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress. *Antioxid Redox Signal*. 11, 2333-2339.

Tabas, I., Tall, A., and Accili, D. (2010). The impact of macrophage insulin resistance on advanced atherosclerotic plaque progression. *Circulation research* 106, 58-67.

Taleb, S., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2010). Adaptive T cell immune responses and atherogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 10, 197-202.

Tanti, J.F., and Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol* 9, 753-762.

Tedgui, A., and Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86, 515-581.

Teran-Garcia, M., Santoro, N., Rankinen, T., Bergeron, J., Rice, T., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., Bergman, R.N., Despres, J.P., *et al.* (2005). Hepatic lipase gene variant -514C>T is associated with lipoprotein and insulin sensitivity response to regular exercise: the HERITAGE Family Study. *Diabetes* 54, 2251-2255.

Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., Chasman, D.I., Willer, C.J., *et al.* (2010). Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466, 707-713.

Todorova, B., Kubaszek, A., Pihlajamaki, J., Lindstrom, J., Eriksson, J., Valle, T.T., Hamalainen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Tuomilehto, J., *et al.* (2004). The G-250A promoter polymorphism of the hepatic lipase gene predicts the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes mellitus: the Finnish Diabetes Prevention Study. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2019-2023.

Toschi V, G.R., Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95, 594-599.

Bibliografía

Touboul, P.J., Hennerici, M.G., Meairs, S., Adams, H., Amarenco, P., Desvarieux, M., Ebrahim, S., Fatar, M., Hernandez Hernandez, R., Kownator, S., *et al.* (2004). Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis* 18, 346-349.

Tse, K., Tse, H., Sidney, J., Sette, A., and Ley, K. (2013). T cells in atherosclerosis. *International immunology* 25, 615-622.

Tuncman, G., Hirosumi, J., Solinas, G., Chang, L., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2006). Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10741-10746.

Turpin, S.M., Hoy, A.J., Brown, R.D., Rudaz, C.G., Honeyman, J., Matzaris, M., and Watt, M.J. (2011). Adipose triacylglycerol lipase is a major regulator of hepatic lipid metabolism but not insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 54, 146-156.

Villuendas, G., Botella-Carretero, J.I., Roldan, B., Sancho, J., Escobar-Morreale, H.F., and San Millan, J.L. (2005). Polymorphisms in the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene and the insulin receptor substrate-2 (IRS-2) gene influence glucose homeostasis and body mass index in women with polycystic ovary syndrome and non-hyperandrogenic controls. *Hum Reprod* 20, 3184-3191.

Virkamäki A, U.K., Kahn CR (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 103(7):931-43.

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.

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, L.M.F., Borst GJ, de Kleijn DP, P M de Vries JP, Pasterkamp G. (2011). Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque. *Curr Cardiol Rev*.

Waksman, R., Torguson, R., Kent, K.M., Pichard, A.D., Suddath, W.O., Satler, L.F., Martin, B.D., Perlman, T.J., Maltais, J.A., Weissman, N.J., *et al.* (2010). A first-in-man,

randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and feasibility of autologous delipidated high-density lipoprotein plasma infusions in patients with acute coronary syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 55, 2727-2735.

Wang, X., Collins, H.L., Ranalletta, M., Fuki, I.V., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., and Tall, A.R., and Rader, D.J. (2007). Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *The Journal of clinical investigation* 117, 2216-2224.

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.

Wei, C.Y., Chou, Y.H., Ho, F.M., Hsieh, S.L., and Lin, W.W. (2006). Signaling pathways of LIGHT induced macrophage migration and vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Physiol* 209, 735-743.

Wei, E., Ben Ali, Y., Lyon, J., Wang, H., Nelson, R., Dolinsky, V.W., Dyck, J.R., Mitchell, G., Korbitt, G.S., and Lehner, R. (2010). Loss of TGH/Ces3 in mice decreases blood lipids, improves glucose tolerance, and increases energy expenditure. *Cell Metab* 11, 183-193.

Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T., Brickey, W.J., and Ting, J.P. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 12, 408-415.

Wigren, M., Bjorkbacka, H., Andersson, L., Ljungcrantz, I., Fredrikson, G.N., Persson, M., Bryngelsson, C., Hedblad, B., and Nilsson, J. (2012). Low levels of circulating CD4+FoxP3+ T cells are associated with an increased risk for development of myocardial infarction but not for stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2000-2004.

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.

Wilfling, F., Haas, J.T., Walther, T.C., and Farese, R.V., Jr. (2014). Lipid droplet biogenesis. *Current opinion in cell biology* 29, 39-45.

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.

Bibliografía

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.

Woollard, K.J., and Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 7, 77-86.

Wouters, K., van Gorp, P.J., Bieghs, V., Gijbels, M.J., Duimel, H., Lutjohann, D., Kerksiek, A., van Kruchten, R., Maeda, N., Staels, B., *et al.* (2008). Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48, 474-486.

Yang, F., Wang, Y., Sternfeld, L., Rodriguez, J.A., Ross, C., Hayden, M.R., Carriere, F., Liu, G., and Schulz, I. (2009). The role of free fatty acids, pancreatic lipase and Ca⁺ signalling in injury of isolated acinar cells and pancreatitis model in lipoprotein lipase-deficient mice. *Acta Physiol (Oxf)* 195, 13-28.

Yki-Jarvinen, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2, 901-910.

Zacharova, J., Todorova, B.R., Chiasson, J.L., and Laakso, M. (2005). The G-250A substitution in the promoter region of the hepatic lipase gene is associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. *J Intern Med* 257, 185-193.

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 (New York, NY)* 316, 1336-1341.

Zhang, C., Lopez-Ridaura, R., Rimm, E.B., Li, T., Hunter, D.J., and Hu, F.B. (2006). Genetic variation in the hepatic lipase gene and the risk of coronary heart disease among US diabetic men: potential interaction with obesity. *Diabetologia* 49, 1552-1559.

Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, NY)* 258, 468-471.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., *et al.* (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80.

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.

ANEXO

PUBLICACIONES RESULTANTES DE ESTA TESIS

AUTORES: Vinué Á, **Andrés-Blasco I**, Herrero-Cervera A, Piqueras L, Andrés V, Burks DJ, Sanz MJ, González-Navarro H.

TÍTULO: *Ink4/Arf* locus restores glucose tolerance and insulin sensitivity by reducing hepatic steatosis and inflammation in mice with impaired IRS2-dependent signalling

REVISTA: Biochimica et Biophysica Acta. 2015 Sep; 1852(9):1729-42

AUTORES: **Andrés-Blasco I**, Herrero-Cervera A, Vinué Á, Martínez-Hervás S, Piqueras L, Sanz MJ, Burks DJ, González-Navarro H.

TÍTULO: Hepatic lipase deficiency produces glucose intolerance, inflammation and hepatic steatosis

REVISTA: Journal of Endocrinology. 2015 Dec; 227(3):179-91. Epub 2015 Sep 30

