



AVANCES EN DIABETOLOGÍA

www.elsevier.es/diabetologia



PREMIO CARRASCO I FORMIGUERA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA JUNIOR

El papel de la lipoatrofia marrón en las alteraciones metabólicas y vasculares asociadas a la obesidad y al envejecimiento

Almudena Gómez-Hernández^{a,b,*}, Yolanda F. Otero^{a,b}, Natalia de las Heras^{c,d},
Óscar Escribano^{a,b}, Victoria Cachofeiro^{c,d}, Vicente Lahera^{c,d} y Manuel Benito^{a,b}

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^bCIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, España

^cDepartamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^dRECAVA, España

PALABRAS CLAVE

Lipoatrofia;
Metabolismo de la
glucosa;
Resistencia a la
insulina;
Disfunción vascular;
Receptor de insulina

Resumen

Introducción: Recientemente se ha identificado que el tejido adiposo marrón (BAT) es funcional en adultos humanos y se ha descrito su papel potencial como diana terapéutica frente a la obesidad y enfermedades metabólicas asociadas.

Objetivo: Analizar el papel de la lipoatrofia marrón y el incremento de masa del tejido adiposo blanco (WAT) en las alteraciones vasculares y metabólicas asociadas a la obesidad y al envejecimiento.

Material y métodos: El modelo carente del receptor de la insulina en el BAT (BATIRKO) fue generado utilizando la expresión de la Cre recombinasa bajo el promotor de la proteína desacoplante 1 (UCP-1).

Resultados: El ratón BATIRKO de 52 semanas presentó lipoatrofia marrón severa asociada a un incremento de la adiposidad visceral. Además, dicho grupo mostró una progresiva intolerancia a la glucosa y una moderada hiperglucemia en el ayuno debido a un defecto en la secreción de la insulina. La lipoatrofia marrón, junto con el aumento de la adiposidad visceral, incrementó de forma concertada la producción de adipocitocinas por ambos tejidos adiposos. Este grupo, aunque no mostró resistencia global a la insulina presentó un fallo en la señalización de insulina en el WAT y en la aorta. Además, el ratón BATIRKO de 52 semanas mostró disfunción vascular, infiltración de macrófagos, estrés oxidativo y un incremento significativo de marcadores de activación endotelial e inflamación.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que la lipoatrofia marrón y el incremento de adiposidad visceral a través de la expresión concertada de citoadipocinas inducen resistencia vascular a la insulina que agrava la disfunción vascular.

© 2011 Sociedad Española de Diabetes. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: almudenagomez@farm.ucm.es (A. Gómez-Hernández).

KEYWORDS

Lipoatrophy;
Glucose metabolism;
Insulin resistance;
Vascular dysfunction;
Insulin receptor

The role of brown lipoatrophy in metabolic and vascular alterations associated to obesity and aging

Abstract

Introduction: Actually, it was identified that brown adipose tissue (BAT) is functional in adult humans and it has described its potential role as therapeutic target against obesity and related metabolic diseases.

Objective: Analyze the role of brown lipoatrophy and the increased of white adipose tissue (WAT) mass in vascular and metabolic alterations associated to obesity and aging.

Material and methods: Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout model (BATIRKO) was generated using the expression of recombinase Cre under the UCP-1 promoter.

Results: 52-week-old BATIRKO mice, but not 33-week-old, had a significant decrease of BAT mass associated to a significant increase of visceral WAT mass. 52-week-old BATIRKO mice showed progressive glucose intolerance and mild fasted hyperglycemia related to an insulin secretion defect. Brown fat lipoatrophy and increased visceral adiposity enhanced the concerted expression of adipocytokines in both adipose tissues. Although those mice showed global insulin sensitivity, insulin signaling in WAT was impaired. More importantly, insulin signaling was impaired at the aorta and in the endothelium. Finally, 52-week-old BATIRKO mice showed vascular dysfunction, macrophage infiltration, oxidative stress, a significant increase of genes markers of endothelial activation and inflammation.

Conclusions: Our results suggested that brown fat lipoatrophy and increased visceral adiposity through the concerted overexpression of cytoadipokines induces vascular insulin resistance that aggravates vascular dysfunction.

© 2011 Sociedad Española de Diabetes. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Abreviaturas

ApoE: apolipoproteína E.
BAT: tejido adiposo marrón.
BATIRKO: carente del receptor de la insulina en el tejido adiposo marrón.
IR: receptor de insulina.
WAT: tejido adiposo blanco.

Introducción

La obesidad se desarrolla cuando el aporte energético excede al gasto energético¹. Hay 2 tipos diferentes de tejido adiposo en cuanto a su composición y distribución en mamíferos: marrón y blanco. El tejido adiposo blanco (WAT) está localizado principalmente en la región subcutánea y en la abdominal y, debido a su función endocrina, produce citocinas y hormonas que modulan el metabolismo humano y la resistencia a la insulina²⁻⁴. La obesidad se caracteriza por un exceso de WAT visceral. Por otro lado, el tejido adiposo marrón (BAT) es escaso y está localizado en las regiones cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal, paraaórtica y suprarrenal^{5,6}, y pequeños depósitos dentro del músculo esquelético en adultos humanos⁷. BAT está formado por adipocitos marrones y células progenitoras de adipocitos, y está altamente vascularizado⁸. La inducción de la termogénesis del BAT reduce la adiposidad y protege a los ratones frente a la obesidad inducida por dieta^{9,10}. La proteína desacoplante 1 (UCP-1) se expresa exclusivamente en las mito-

condrias del BAT y desempeña la función de éste¹¹. Estudios de animales carentes del BAT o de UCP-1 han demostrado claramente como la termogénesis del BAT protege frente a la obesidad¹². Además, individuos con valores bajos de BAT son propensos a acumular WAT en exceso y a la ganancia de peso corporal^{9,13}. Además, la adiposidad visceral y la obesidad están fuertemente asociadas con un mayor riesgo de diversas enfermedades asociadas al envejecimiento¹⁴. Además, en los últimos años, hay evidencias de la presencia y de la funcionalidad del BAT en los adultos humanos y su correlación inversa con el índice de masa corporal¹⁵.

En este contexto, el ratón BATIRKO es un modelo único de lipoatrofia marrón y diabetes debido al defecto intrínseco en la secreción de la insulina¹⁵. Así, en este trabajo hemos analizado el papel de la lipoatrofia marrón severa en las alteraciones metabólicas y vasculares asociadas a la obesidad y al envejecimiento.

Material y métodos**Animales**

El grupo control está formado por ratones IR^(loxP/loxP) C57BL/6 y ratones *wild-type* C57BL/6. El ratón transgénico expresa Cre-recombinasa bajo el control del promotor de UCP-1, como se ha descrito¹⁵. El ratón BATIRKO se generó a partir del ratón transgénico UCP-1 Cre y el IR^(loxP/loxP). A ambos grupos de ratones macho, BATIRKO y control, se les administró una dieta estándar (3% de las calorías provienen de la grasa) y fueron sacrificados a las 33 y 52 semanas (ratones adultos

y viejos, respectivamente) El genotipaje de los ratones transgénicos IR^(loxP/loxP) y UCP-1-Cre se realizó por PCR como se ha descrito previamente¹⁵. Todos los animales de experimentación descritos se han utilizado de acuerdo con los estándares del cuidado de animales habiéndose aprobado por los comités éticos de nuestra institución.

Estudios in vivo de la señalización de la insulina

Para los estudios in vivo de la señalización de la insulina, se les inyectaron 1 U/kg de insulina en la cavidad peritoneal. Después de 10 min, los tejidos se extrajeron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Se estudió mediante *western blot* p-AKT (Ser473) en el BAT, WAT, hígado, músculo esquelético y arteria aorta así como la fosforilación de eNOS (Ser1177) en la aorta.

Western blot analysis

El análisis de *western blot* se realizó como se ha descrito¹⁶. Los anticuerpos utilizados anti-IR IR β (Ab-4) de oncogene, p-eNOS (Ser1177), eNOS y anti-UCP-1 de Santa Cruz Biotechnology, p-AKT (Ser 473), AKT de Cell Signaling, anti-TNF- α , antileptina y antiadiponectina de Millipore y α -actina de músculo liso, anti- β -actina and tubulina de Sigma.

Procedimientos analíticos

Los valores plasmáticos de insulina, leptina y TNF- α se analizaron por ELISA (Millipore y SABioSciences). Los valores de colesterol y triglicéridos se testaron en las muestras del plasma (Spinreact). La concentración de glucosa se determinó en ratones ayunados utilizando un glucómetro automático (Boehringer-Mannheim GmbH). Los experimentos de secreción de insulina, y los test de tolerancia a la glucosa y a la insulina se realizaron como se ha descrito¹⁵.

Análisis histológico

La inmunohistoquímica (IHC) frente a UCP-2 en el páncreas se realizó como se había descrito¹⁶. La acumulación de lípidos se midió por una tinción con OilredO. El infiltrado de macrófagos y los valores de nitrotirosina se detectaron por IHC con anticuerpos específicos como antirratón F4/80 (serotec) y un anticuerpo policlonal antinitrotirosina (Upstate). Después de la incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa durante 1 h. Las secciones fueron teñidas durante 10 min a temperatura ambiente con DAB y contrastadas con hematoxilina. En cada experimento se incluyeron controles negativos sin anticuerpo primario para comprobar la tinción inespecífica.

Reactividad vascular

La función vascular se estudió en los anillos aórticos de ratones control y BATIRKO a las 33 y 52 semanas. La función endotelial se estudió evaluando las relajaciones dependientes de endotelio inducidas por acetilcolina (10^{-9} a 10^{-5} mol/l) o frente a insulina (10^{-10} a 10^{-6} mol/l) en anillos aórticos precontraídos previamente frente a fenilnefrina (PE; 10^{-6} mol/l).

PCR cuantitativa a tiempo real

La expresión de los genes estudiados fue realizada por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) como se ha descrito¹⁶. Así, la cantidad de los distintos genes se normalizó por un gen endógeno (*GADPH*) y se relativizó cada uno a su control. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta Ct = Ct$ (gen diana) - Ct (*GADPH*); $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ para una muestra - ΔCt para el control].

Formación del anión superóxido

Para evaluar los valores del anión superóxido en secciones de arcos aórticos se utilizó la hidroxietidina (HE) como se ha descrito¹⁷.

Análisis estadístico

Todos los valores son expresados como media $\pm$ SEM. Los datos se analizaron usando un análisis de varianza seguido por el test de Bonferroni. Se ha considerado significativo cuando el valor de $p < 0,05$. Las correlaciones que se han establecido se han hecho utilizando los test de Spearman.

Resultados

Implicación de la lipoatrofia marrón en la obesidad y en las alteraciones del metabolismo de la glucosa

En primer lugar, el ratón BATIRKO presenta un descenso significativo de la masa del BAT (lipoatrofia marrón severa) con respecto a sus controles, siendo ésta consecuencia de la deleción específica del IR en dicho tejido. Además, este hecho confiere susceptibilidad a la obesidad como se puede observar a las 52 semanas, ya que presentó un incremento de la adiposidad visceral e hiperleptinemia (tabla 1).

Por otro lado, la lipoatrofia marrón, además de conferir susceptibilidad a la obesidad, se ha observado que tiene consecuencias directas en el metabolismo de la glucosa. Así, el ratón BATIRKO mostró una progresiva intolerancia a la glucosa con hiperglucemia en el ayuno sin tener resistencia global a la insulina debido a un defecto en la secreción de la insulina (tabla 1; fig. 1A, B y C). Esto se correlaciona con la hipoinsulinemia (tabla 1). Además, está bien establecido que un incremento de los valores de UCP-2 de las células beta está asociado con un defecto en la secreción de la insulina¹⁸. En este sentido, el ratón BATIRKO, principalmente a las 52 semanas, presentó un incremento significativo de la expresión de UCP-2 en los islotes pancreáticos (fig. 1D). Este incremento de UCP-2 en los islotes fue en paralelo con el incremento de expresión de UCP-1 en el BAT del ratón BATIRKO envejecido (fig. 1E).

Implicación del tejido adiposo marrón en la resistencia vascular a la insulina

Como la obesidad es un proceso inflamatorio de bajo grado, se observó un incremento significativo de la expresión de TNF- α , leptina y PAI-1 en ambos tejidos adiposos del ratón BATIRKO envejecido (fig. 1F). Además, se encontró una correlación de la expresión de estas adipocitocinas descritas

Tabla 1 Perfil metabólico y lipídico de ratones control y BATIRKO

	Control 33w	BATIRKO 33w	Control 52w	BATIRKO 52w
Peso corporal (g)	28,9 ± 0,7	27,9 ± 1	31,68 ± 0,8 ^{a,b}	32,88 ± 0,5 ^{a,b}
WAT (mg)/peso corporal (g)	15,5 ± 1,5	21,0 ± 3,5	20,89 ± 2,6	40,41 ± 1,6 ^{a,b,c}
BAT (mg)/peso corporal (g)	2,39 ± 0,2	0,86 ± 0,07 ^{a,c}	3,01 ± 0,3	0,88 ± 0,2 ^{a,c}
Insulina (ng/ml)	0,37 ± 0,08	0,18 ± 0,02	1,86 ± 0,8 ^{a,b}	0,71 ± 0,3 ^b
Glucosa (mg/dl)	120,7 ± 5,9	125,4 ± 7,8	118,8 ± 3,6	145,9 ± 3,9 ^c
TNF- α (pg/ml)	6,4 ± 1,3	6,3 ± 1	12,36 ± 4,5	20,4 ± 13,1 ^{a,b,c}
Leptina (ng/ml)	2,8 ± 0,3	3,8 ± 0,6	3,3 ± 0,8	7,7 ± 1,3 ^{a,b,c}
Colesterol (mg/dl)	82,3 ± 6,9	72,5 ± 2,4	88,1 ± 7	69,5 ± 4,8
TG (mg/dl)	31,4 ± 1,5	32,3 ± 3,8	45,7 ± 15	46,1 ± 10

Control 33w: grupo de ratones control a las 33 semanas; BATIRKO 33w: grupo de ratones BATIRKO a las 33 semanas; Control 52w: grupo de ratones control a las 52 semanas; BATIRKO 52w: grupo de ratones BATIRKO a las 52 semanas.

^ap < 0,05 frente a C33w.

^bp < 0,05 frente a B33w.

^cp < 0,05 frente a C52w.

Todos los animales BATIRKO mostraron una lipoatrofia marrón severa (disminución del ratio del BAT/peso corporal). El ratón BATIRKO a las 52 semanas de edad presentó obesidad (incremento del ratio WAT/peso corporal e hiperleptinemia), valores altos del TNF- α , hipoinsulinemia y moderada hiperglicemia en el ayuno. No se observaron cambios significativos en el perfil lipídico de los 4 grupos estudiados.

con los valores circulantes en el ratón BATIRKO envejecido (tabla 1; fig. 1F).

Para ensayar si este aumento en los valores de adipocitocinas proinflamatorias por ambos tejidos adiposos podría afectar a la sensibilidad a la insulina en otros tejidos periféricos, se realizaron estudios in vivo de la señalización de insulina en los tejidos periféricos. En primer lugar, el ratón BATIRKO mostró resistencia primaria a la insulina en el tejido adiposo marrón (fig. 1G). Además, se observó sensibilidad a la insulina en hígado y músculo esquelético de BATIRKO envejecido (fig. 1G), siendo consistentes con la sensibilidad global a la insulina (fig. 1B). Sin embargo, la señalización de insulina estaba marcadamente disminuida en el WAT debido a la adiposidad generada. Más relevante fue el hecho de ver cómo esta señalización de insulina también fallaba en la aorta, como puede observarse al no inducirse la fosforilación de AKT y eNOS en respuesta a insulina (fig. 1G). Estos resultados sugieren que el ratón BATIRKO envejecido mostró resistencia a la insulina en la arteria aorta y en el endotelio.

Implicación de la lipoatrofia marrón en la disfunción vascular y en la inflamación de la arteria aorta

Como el ratón BATIRKO envejecido tiene inflamación sistémica y resistencia macrovascular a la insulina, nos planteamos si ambos eventos podrían contribuir a agravar el daño vascular. En primer lugar, estudiamos la función endotelial, se observó una menor respuesta de relajación frente a acetilcolina en anillos aórticos del ratón BATIRKO envejecido con respecto al resto de grupos (fig. 2A). Al mismo tiempo se observó un incremento significativo de la expresión de genes implicados en la activación endotelial (ET-1, ICAM-1 y eNOS) (fig. 2C).

Por otro lado se observó una menor respuesta de relajación frente a insulina en los anillos aórticos del ratón BA-

TIRKO envejecido comparado con los del grupo control (fig. 2B). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en la figura 1G que describían el fallo en la señalización de insulina en la arteria aorta, confirmando la resistencia vascular a la insulina.

Se analizó el perfil lipídico para conocer si la acumulación lipídica podría contribuir a las alteraciones vasculares observadas en el ratón BATIRKO envejecido. En este sentido, observamos que no hubo cambios significativos de los valores plasmáticos del colesterol y los triglicéridos entre los distintos grupos (tabla 1), así como tampoco se detectaron depósitos lipídicos en el arco aórtico del ratón BATIRKO envejecido (fig. 2D). Sin embargo, en el arco aórtico de ese grupo se observó infiltración de macrófagos y un incremento significativo de la expresión de MCP-1 (fig. 2D y E). Además, se obtuvo también un incremento de la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio (iNOS, TNF- α y PAI-1) en el arco aórtico de BATIRKO envejecido (fig. 2E).

Papel del estrés oxidativo en la disfunción vascular

El estrés oxidativo podría ser uno de los primeros mecanismos implicados en la disfunción vascular observada en el ratón BATIRKO envejecido. Así, en los arcos aórticos de dicho grupo se observó un incremento significativo de los valores de nitrotirosina y del anión superóxido (fig. 3A y B). Además, confirmamos que los valores elevados en la producción de ROS se debían a un desequilibrio entre la expresión de enzimas oxidantes (NOX-4) y antioxidantes (SOD-2, Gpx-1 y -4) en la arteria aorta (fig. 3C).

Discusión

El modelo BATIRKO desarrolla una lipoatrofia marrón severa debido a la delección específica del IR en el BAT. Este hecho

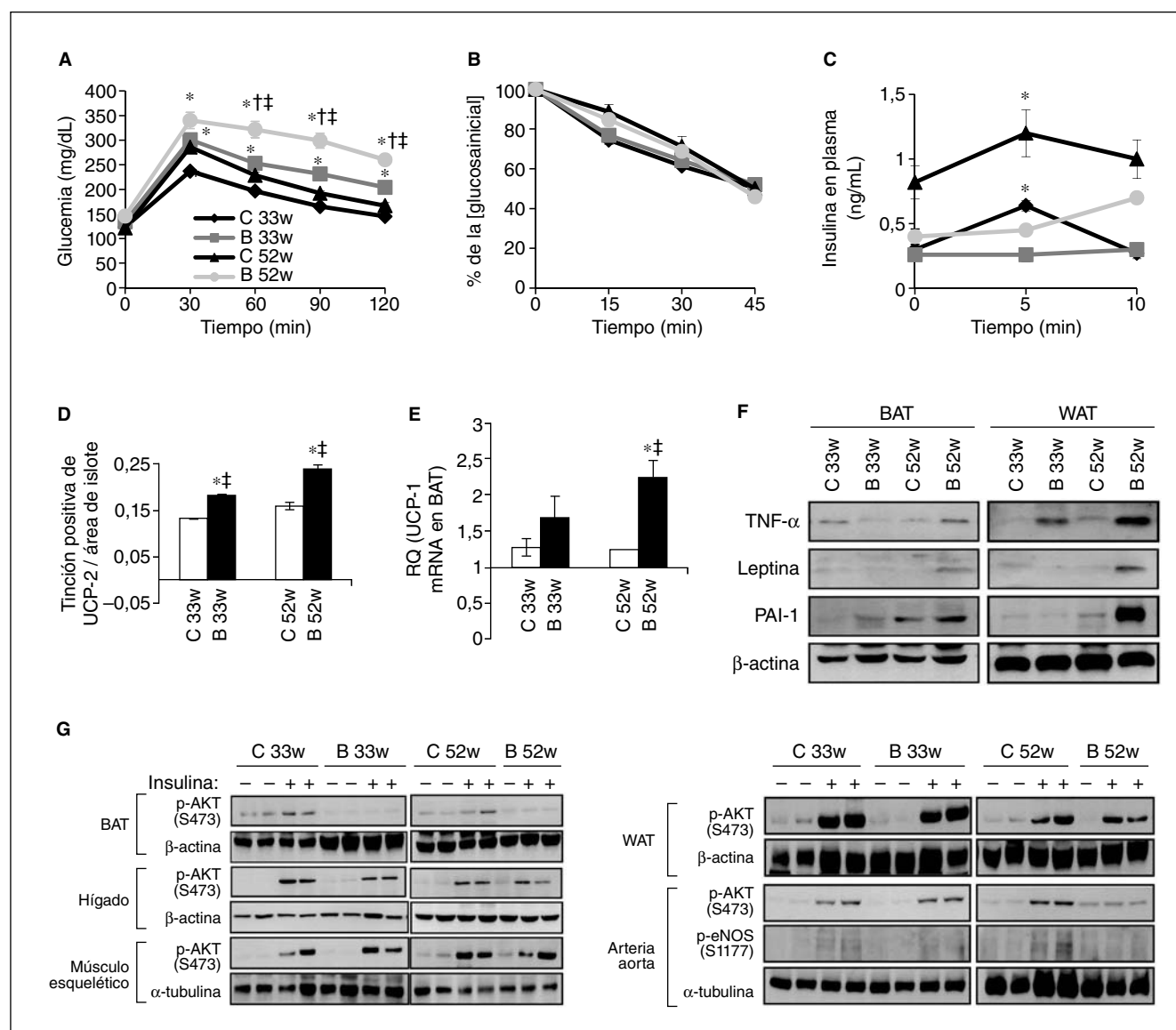


Figura 1 Caracterización del modelo BATIRKO envejecido. Curvas de tolerancia a la glucosa (A) y a la insulina (B) realizadas en ratones control y BATIRKO de 33 y 52 semanas de edad. (C) Test de secreción aguda a la insulina en ratones control y BATIRKO. * $p < 0,05$ frente a valores plasmáticos de insulina previo a la inyección con glucosa. (D) Cuantificación de la inmunohistoquímica de UCP-2 en el páncreas, que se expresa como tinción positiva por área del islote. (E) Expresión de UCP-1 en BAT analizada por qRT-PCR. (F) Análisis por western blot de la expresión de adipocitocinas en BAT y en WAT de ratones control y BATIRKO. (G) Fosforilación de Akt en respuesta a insulina de ratones control y BATIRKO. C33w: control de 33 semanas ($n = 12$); B33w: BATIRKO de 33 semanas ($n = 10$); C52w: control de 52 semanas ($n = 12$); B52w: BATIRKO de 52 semanas ($n = 8$). * $p < 0,05$ frente a C33w; † $p < 0,05$ frente a B33w; ‡ $p < 0,05$ frente a C52w.

confiere susceptibilidad a desarrollar obesidad¹⁹. Recientemente se ha descrito que la cantidad de BAT está inversamente correlacionada con el índice de masa corporal⁵. En este sentido, la lipoatrofia marrón producida en nuestro modelo es suficiente para producir obesidad. Además, el ratón BATIRKO presentó una progresiva intolerancia a la glucosa, hipoinsulinemia e hipoplasia pancreática, y moderada hiperglucemia en el ayuno a las 52 semanas de edad sin resistencia global a la insulina. Estas alteraciones en el metabolismo de la glucosa se podrían deber al defecto en la secreción de la insulina por un

aumento en la expresión de UCP-2 en los islotes pancreáticos. En este sentido, se ha descrito previamente el papel negativo de UCP-2 en la secreción de insulina de las células beta del páncreas¹⁸.

Se ha observado que la resistencia primaria a la insulina en BAT del ratón BATIRKO se debe a la delección del IR específicamente en dicho tejido. Además, la señalización de la insulina en el WAT del ratón BATIRKO envejecido está afectada debido al incremento de adiposidad visceral. La arteria aorta del ratón BATIRKO envejecido también tiene afectada la señalización de insulina. Estos resultados

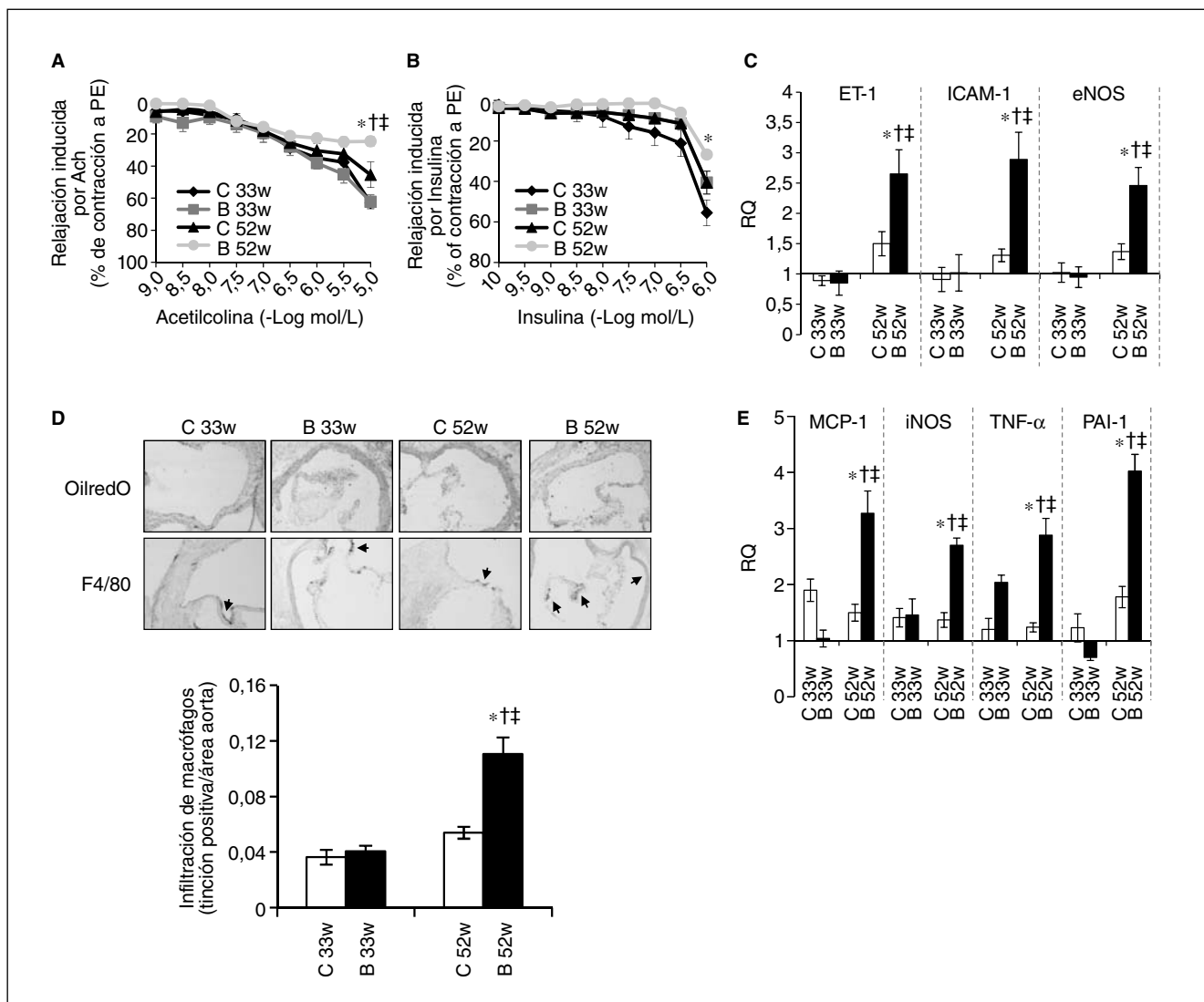


Figura 2 Estudio de las alteraciones vasculares en el modelo BATIRKO envejecido. Respuestas de relajación frente a acetilcolina (ACh; 10^{-9} to 10^{-5} mol/L) (A) o insulina (ins; 10^{-10} to 10^{-6} mol/L) (B) en anillos aórticos previamente precontraidos con fenilnefrina (10^{-6} mol/L). (C) Expresión de genes implicados en la disfunción vascular (ET-1, ICAM-1 y eNOS) de la arteria aorta de ratones control y BATIRKO por qRT-PCR como se indica en materiales y métodos. (D) Fotografías representativas de la tinción con OilredO (lípidos) y de la IHC frente a los Rc F4/80 (infiltración de macrófagos) en los arcos aórticos del ratón control y BATIRKO a 33 y 52 semanas. En la parte inferior, cuantificación del infiltrado de macrófagos expresado como tinción positiva por área de la aorta. (E) Expresión de genes implicados en la inflamación (MCP-1, iNOS, TNF- α y PAI-1) de la arteria aorta de ratones control y BATIRKO por qRT-PCR como se indica en materiales y métodos.

C33w: control de 33 semanas (n = 12); B33w: BATIRKO de 33 semanas (n = 10); C52w: control de 52 semanas (n = 12); B52w = BATIRKO de 52 semanas (n = 8). *p < 0,05 frente a C33w; †p < 0,05 frente a B33w; ‡p < 0,05 frente a C52w.

sugieren que la resistencia vascular a la insulina podría agravar la disfunción vascular observada en el ratón BATIRKO de 52 semanas. En este sentido, se ha descrito que la pérdida de la señalización de insulina en las células endoteliales vasculares acelera la aterosclerosis de los ratones ApoE^{-/-}20.

Además, la obesidad es una enfermedad inflamatoria21 y podría ser uno de los mecanismos implicados en la resistencia vascular a la insulina observada en el ratón BATIRKO envejecido. Así, se ha descrito que la obesidad es clave en la disfunción vascular y en la inflamación de ratas

hipertensas sometidas a dieta grasa22 y como los marcadores proinflamatorios secretados por WAT podrían participar en la disfunción del modelo experimental de obesidad23. Así, cambios en el tejido adiposo están asociados con la disfunción sistémica arterial y resistencia a la insulina, sugiriendo que la inflamación del tejido adiposo podría estar unido al daño vascular y a un aumento del riesgo cardiovascular en sujetos obesos24. En este sentido, se ha encontrado un aumento significativo de la expresión de adipocinas y moléculas proinflamatorias en el BAT y en el WAT del ratón BATIRKO envejecido. Estos incrementos

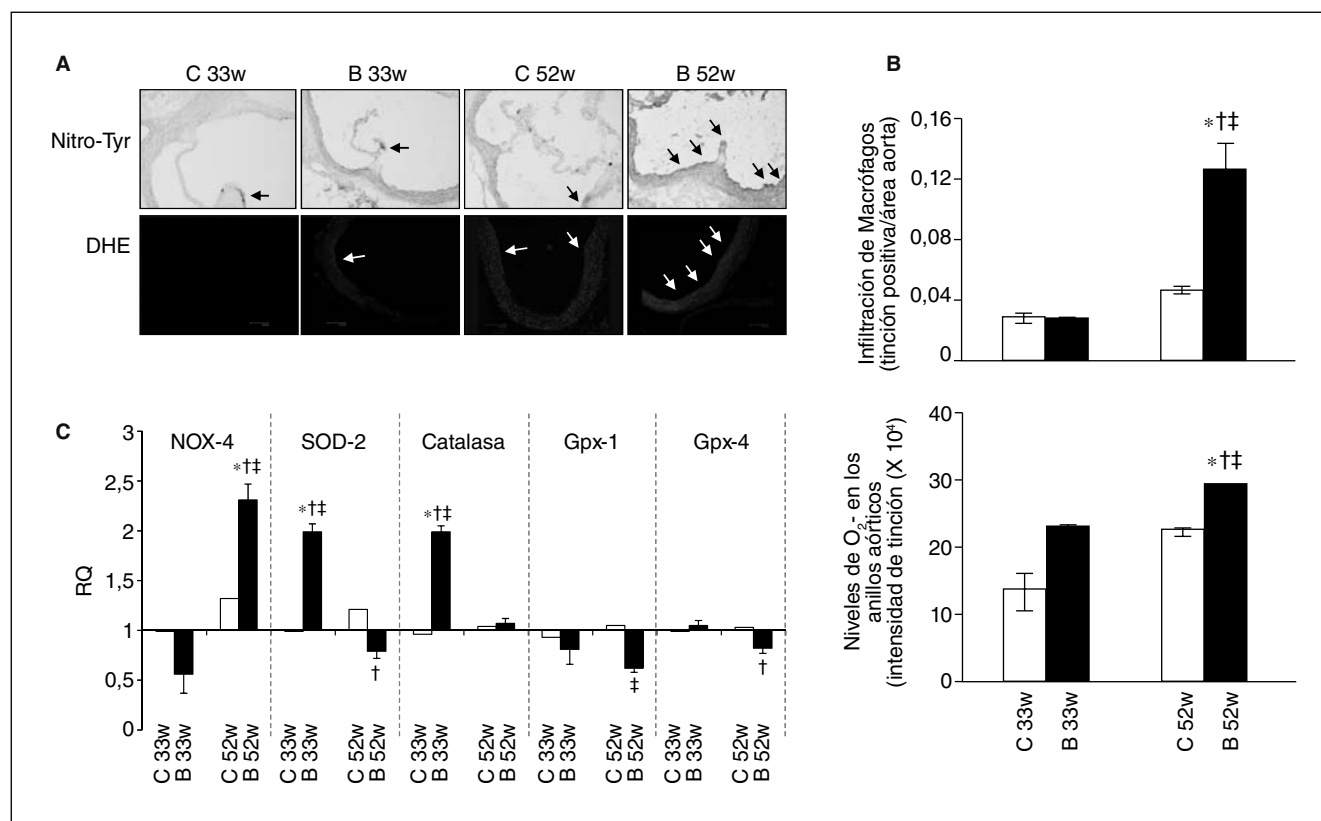


Figura 3 Participación del estrés oxidativo en la disfunción vascular. Fotografías representativas (A) y cuantificaciones (B) de la IHC frente a nitro-Tyr y con el método de hidroxietidina (anión superóxido) en los arcos aórticos del ratón control y BATIRKO a 33 y 52 semanas. (C) Expresión de genes implicados en el estrés oxidativo de la arteria aorta de ratones control y BATIRKO por qRT-PCR como se indica en “material y métodos”. Se analizaron tanto la expresión de enzimas oxidantes (NOX-4) como de enzimas antioxidantes (SOD-2, catalasa, Gpx-1 y -4). C33w: control de 33 semanas (n = 12); B33w: BATIRKO de 33 semanas (n = 10); C52w: control de 52 semanas (n = 12); B52w: BATIRKO de 52 semanas (n = 8). *p < 0,05 frente a C33w; †p < 0,05 frente a B33w; ‡p < 0,05 frente a C52w.

concertados se reflejan también a nivel sistémico y local de la arteria aorta. Así, se observó un incremento significativo del infiltrado de macrófagos en el arco aórtico así como de la expresión de moléculas proinflamatorias en la arteria aorta. Esta inflamación local generada en la arteria aorta contribuye a la disfunción vascular observada en el ratón BATIRKO envejecido. Por otro lado, se ha descrito previamente que hay una relación entre la formación intracelular de ROS y la disfunción endotelial expuesta a TNF- α , demostrando su participación en la enfermedad cardiovascular²⁵. Además, la disfunción endotelial es un factor determinante de la reactividad vascular alterada y desempeña un papel clave en la génesis de las complicaciones macro y microvasculares en la diabetes²⁶.

Se ha observado que la expresión de eNOS en la arteria aorta está aumentada posiblemente como mecanismo compensatorio frente al daño endotelial generado en la arteria aorta del ratón BATIRKO envejecido. Así, se ha demostrado que la expresión de eNOS está aumentada en respuesta a la hipercolesterolemia²⁷. Además, se ha descrito que la producción de ROS dentro del endotelio desempeña un papel clave en la disfunción endotelial. Nuestros resultados demuestran que el ratón BATIRKO envejecido con disfunción endotelial tiene valores elevados de anión superóxido y de nitro-Tyr en el arco aórtico. Estos resultados

sugieren que ROS y RNS podrían ser uno de los mecanismos implicados en la disfunción vascular observada en dicho grupo. Así, tanto en el ratón BATIRKO envejecido como en el ratón IRKO²⁸, la expresión de eNOS está aumentada potencialmente como mecanismo compensatorio por la menor disponibilidad de NO, ya que reacciona con ROS. Por otro lado, altos valores de ROS se pueden deber al desequilibrio entre la expresión de enzimas oxidantes y antioxidantes. SOD-2 es una enzima que protege frente al estrés oxidativo y la disfunción endotelial en las arterias aortas del ratón ApoE^{-/-}²⁹. Además, la disfunción endotelial, así como la mayor producción de ROS, activa una gran variedad de vías de señalización proinflamatorias, como hemos descrito en la arteria aorta del ratón BATIRKO envejecido.

Conclusiones

En resumen, nuestros resultados sugieren que la lipopatía marrón y el aumento de la adiposidad visceral a través de la producción de adipocitocinas son suficientes para producir resistencia vascular a la insulina, disfunción vascular y un incremento significativo de la expresión de genes implicados en la activación endotelial, la inflamación y el estrés

oxidativo. Finalmente, se sugiere que la resistencia vascular a la insulina asociada a la lipoatrofia marrón severa agrava la disfunción vascular.

Agradecimientos

Los autores agradecen la asistencia técnica a Gema García y Sylvia Fernández.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por SAF2005/00014, SAF2007/60058 y SAF2008/00031 del Ministerio de Ciencia e Innovación. CIBERDEM es un proyecto de ISCIII.

Bibliografía

- Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science*. 2005;307:373-5.
- Aldhahi W, Hamdy O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep*. 2003;3:293-8.
- Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64:355-65.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006;444:847-53.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360:1509-17.
- Farmer SR. Brown fat and skeletal muscle: unlike cousins? *Cell*. 2008;134:726-7.
- Almind K, Manieri M, Sivitz WI, Cinti S, Kahn CR. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:2366-71.
- Mattson MP. Perspective: does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Res Rev*. 2010;9:69-76.
- Ghorbani M, Claus TH, Himms-Hagen. Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *J Biochem Pharmacol*. 1997;54:121-31.
- Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 1998;102:412-20.
- Aquila H, Link TA, Klingenberg M. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J* 1985;4:2369-76.
- Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, et al. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Ageing Cell*. 2005;4:147-55.
- Hansen JB, Kristiansen K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J*. 2006;398:153-68.
- Phillips LK, Prins JB. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2008;10:156-64.
- Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Brüning J, Kozak LP, et al. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knock-out shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest*. 2001;108:1205-13.
- Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. Beta-cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreatic endocrine axis through insulin receptor α isoform. *Diabetes*. 2009;58:820-8.
- Lund DD, Faraci FM, Miller FJ Jr, Heistad DD. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves relaxation of carotid arteries from diabetic rabbits. *Circulation*. 2000;101:1027-33.
- Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, et al. Increased uncoupling protein-2 levels in beta cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes*. 2001;50:1302-10.
- Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*. 1993;366:740-2.
- Rask-Madsen C, Li Q, Freund B, Feather D, Abramov R, Wu IH, et al. Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. *Cell Metab*. 2010;11:379-89.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793-801.
- Elmarakby AA, Imig JD. Obesity is the major contributor to vascular dysfunction and inflammation in high-fat diet hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*. 2010;118:291-301.
- Horriño R, González-Pérez A, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Ferré N, Titos E, et al. 5-lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. *J Immunol*. 2010;184:3978-87.
- Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1654-9.
- Chen X, Andresen BT, Hill M, Zhang J, Booth F, Zhang C. Role of reactive oxygen species in tumor necrosis factor- α induced endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rev*. 2008;4:245-55.
- Hsueh WA, Quinones M, Creager MA. Endothelium in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Rev*. 1997;5:343-52.
- Li H, Wallerath T, Münzel T, Förstermann U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide*. 2007;7:149-64.
- Duncan ER, Walker SJ, Ezzat VA, Wheatcroft SB, Li JM, Shah AM, et al. Accelerated endothelial dysfunction in mild prediabetic insulin resistance: the early role of reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E1311-9.
- Ohashi M, Runge MS, Faraci FM, Heistad DD. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2331-6.