

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA. FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTOS DE LA ADIPONECTINA EN LA HOMEOSTASIS DE LOS CARBOHIDRATOS

**MASTER EN BIOLOGIA MOLECULAR Y
CELULAR**

REBECA LOPEZ PEREZ

**Director: Dr. Jose Miguel Arbones Mainar
Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Unidad de Investigación Traslacional Hospital
Universitario Miguel Servet.**

INDICE

Índice	3
Abreviaturas	5
1. Introducción	7
1.1. Obesidad y tejido adiposo	7
1.2. Estructura de la adiponectina	8
1.3. Modificaciones post-traduccionales	10
1.4. Regulación transcripcional de la adiponectina	11
1.5. Receptores	11
1.6. Mecanismos de acción de la adiponectina	12
1.7. Efectos fisiológicos de la adiponectina	13
1.8. Adiponectina y diabetes tipo 2	14
1.9. Vectores lentivirales	15
2. Objetivos	17
3. Metodología	19
3.1. Cepa bacteriana y vectores plasmídicos	19
3.2. Líneas celulares modelo	19
3.3. Medios de cultivo	20
3.4. Primers	21
3.5. Transformación de células <i>E.coli</i>	21
3.6. Extracción de los plásmidos	22
3.7. Cultivo celular y diferenciación	22
3.8. Clonajes	22
3.8.1. Subclonaje	22
3.8.2. Clonaje	23
3.9. Lentivirus	24
3.9.1. Producción de partículas lentivirales	24
3.9.2. Infección de las líneas celulares C2C12 y 3T3L1	24

3.10.	Extracción de RNA total	25
3.11.	RT-PCR y qPCR	26
3.12.	Extracción de proteínas totales	26
3.13.	Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE y Western blot	26
3.13.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
3.13.2.	Transferencia de proteínas a la membrana e inmunodetección	27
3.14.	Captación deoxi-D-Glucosa tritiada	28
3.15.	β -Oxidación	28
3.16.	Tinción de la grasa de adipocitos	29
3.17.	Análisis estadístico	29
4.	Resultados	31
4.1.	Obtención del plásmido de transferencia con el gen Adipoq	31
4.2.	Subclonaje	31
4.3.	Clonaje en el vector de transferencia	32
4.4.	Lentivirus	33
4.4.1.	Producción de partículas lentivirales	33
4.4.2.	Infección de las líneas celulares C2C12 y 3T3L1	34
4.5.	Sobreexpresión de adiponectina en 3T3L1-Adipoq y C2C12-Adipoq	35
4.6.	Funcionalidad de la adiponectina	38
4.6.1.	Secreción de complejos de adiponectina	38
4.6.2.	Diferenciación líneas celulares	41
4.7.	Implicaciones metabólicas de la sobreexpresión de Adipoq	42
4.7.1.	Absorción de glucosa	43
4.7.2.	β -Oxidación	44
4.7.3.	Expresión génica	44
5.	Discusión	47
6.	Conclusiones	51
7.	Bibliografía	53

ABREVIATURAS

μCi	Microcurio
aa	Aminoácidos
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
BMI	Índice masa corporal: peso (Kg)/altura ² (m ²)
BSA	Albumina bovina sérica
CPM	Cuentas por minuto
CPT-1	Carnitina palmitoil transferasa-1
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Fas	Acido graso sintasa
FBS	Suero fetal bovino
G-6-Pase	Glucosa 6 fosfatasa
GST	Glutación transferasa
IRS-1	Sustrato del receptor de la insulina-1
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia
LB	Medio Luria-Bertrani
MAPK	Proteína quinasa p38 activada por mitógenos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
pI	Punto Isoeléctrico
PI3-K	fosfatidil inositol 3 kinasa
PKA	Proteína kinasa A
PPARγ	Receptor gamma activador de la proliferación de los peroxisomas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa

SDS	Dodecil sulfato sodico
TAE	Tampon tris-acetato-EDTA
TZDs	Tiazoladinedionas

1. INTRODUCCION

1.1. OBESIDAD Y TEJIDO ADIPOSO

La obesidad se define como la acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS). De etiopatogenia multifactorial, en su inicio y desarrollo están involucrados factores de diverso tipo como son ambientales, genéticos, sociales y psicológicos (1). El parámetro más utilizado para cuantificar la obesidad es el índice de masa corporal (IMC, kg/m^2), que se calcula dividiendo el peso del individuo en kilogramos entre la altura expresada en metros al cuadrado. Atendiendo a esta fórmula se definen distintos grados de obesidad.

Clasificación de IMC	
Insuficiencia ponderal	$< 18,5$
Intervalo normal, normopeso	$18,5 - 24,9$
Sobrepeso	$25,0 - 29,9$
Obesidad clase I	$30,0 - 34,9$
Obesidad clase II	$35,0 - 39,9$
Obesidad clase III obesidad mórbida	≥ 40

Tabla 1: Clasificación del IMC según la OMS

Diversos estudios epidemiológicos asocian la obesidad y el sobrepeso con un aumento de comorbilidades como enfermedades de las articulaciones, ciertos tipos de cáncer, diabetes de tipo 2 y enfermedad cardiovascular (1). En condiciones fisiológicas normales, el almacenamiento de lípidos se produce de una forma segura en el tejido adiposo. Sin embargo, en situación de obesidad, el tejido adiposo queda desbordado y este almacenamiento también se produce en otros órganos como el hígado y el músculo. Esto constituye un almacenamiento ectópico de grasa y puede estar asociado con lipotoxicidad debido al acúmulo de productos dañinos del metabolismo de lípidos, como ceramidas o diacilgliceroles (2) (3). Para investigar todos estos fenómenos hay que estudiar el tejido adiposo y comprender que el adipocito no es simplemente un “almacén” de ácidos grasos, sino que cumple importantes funciones en la homeostasis del organismo. Actualmente el tejido adiposo se considera un órgano endocrino que secreta un gran número de proteínas que intervienen en la regulación de procesos fisiológicos. En conjunto, estas proteínas se denominan adipoquinas y algunas de ellas son la leptina, resistina, adipsina y adiponectina (4). En esta última se centra nuestro estudio.

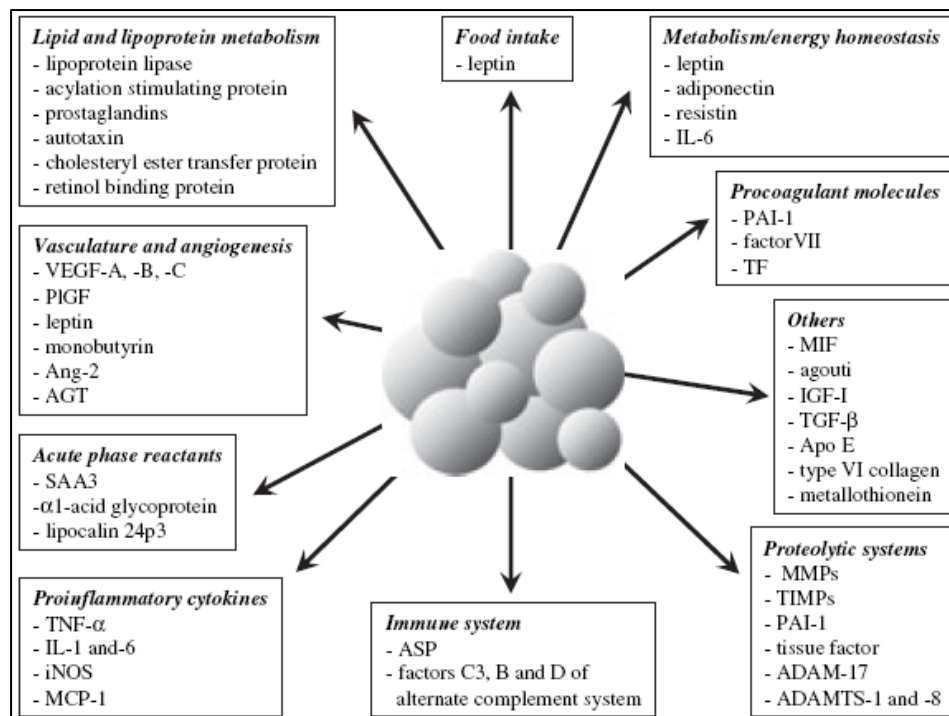


Figura 1: Tejido adiposo como órgano endocrino. El tejido adiposo secreta una gran número de proteínas que ejercen diversos efectos en el organismo (56)

1.2. ESTRUCTURA DE LA ADIPONECTINA

En humanos, el gen de la adiponectina (*ADIPOQ*) se localiza en el brazo largo del cromosoma 3, en el locus 3q27 y está formado por 3 exones y 2 intrones que se extienden a lo largo de 17 Kb (5). Este locus se ha asociado a diabetes tipo 2 (6). En ratón, el gen de la adiponectina (*Adipoq*) se localiza en el cromosoma 16. La adiponectina fue descubierta por Scherer y colaboradores en 1995 (7) y presenta una gran homología con subunidades de C1q y colágeno tipo VIII y X (7). En las primeras referencias sobre la adiponectina se describe su estructura, que consta de cuatro dominios (Fig 2): una secuencia señal en el extremo amino terminal que permite la secreción de la adiponectina, seguida de un dominio variable, un dominio colágeno y un dominio globular en su extremo carboxilo terminal (7). La proteína humana tiene 244 aa mientras que la de ratón tiene 247 aa. Estas pequeñas diferencias son debidas al dominio variable de la adiponectina (8).

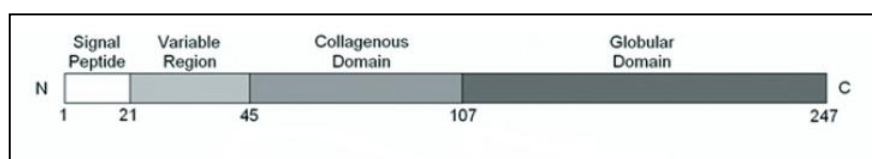


Figura 2. Dominios en la secuencia de adiponectina de ratón (18)

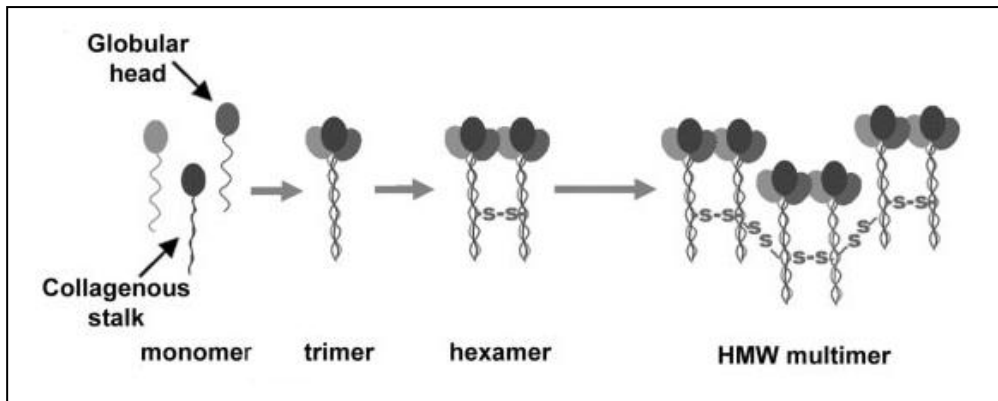


Figura 3: Representación esquemática de los multímeros de adiponectina (18)

La adiponectina se sintetiza como un monómero y posteriormente se van ensamblando los distintos homocomplejos. En la circulación se observan trímeros (low-molecular weight, LMW), hexámeros (medium-molecular weight, MMW), y complejos formados por 12-18 unidades (high molecular weight, HMW) (8). Mediante microscopía electrónica, se puede apreciar que los trímeros presentan una cabeza globular seguida de un tallo de triple hélice y una esfera globular de menor tamaño en el extremo opuesto (9). Esta estructura se forma gracias a interacciones hidrófobas entre sus cabezas globulares e interacciones no covalentes entre los dominios colágenos que forman una triple hélice. La forma MMW, consta de dos dominios globulares triméricos adyacentes y un único tallo formado por dominios de colágeno. Se forma gracias a enlaces disulfuro entre dos trímeros (9). Estos enlaces disulfuro se forman entre residuos de cisteína localizados en el dominio variable (Cys³⁶ en humano y Cys³⁹ en ratón)(8). La eliminación o sustitución de este residuo impide la formación de estructuras superiores al trímero (8). Los complejos de orden superior, HMW, presentan gran heterogeneidad en cuanto al número de subunidades que los constituyen posiblemente debido a que el residuo cisteína importante para la multimerización se encuentra en la región variable en el extremo amino-terminal y esta región tiene muy baja homología entre especies(8).

En esta multimerización participa la chaperona del retículo endoplásmico, ERp44 (10). ERp44 interacciona de forma covalente con la Cys³⁶ y mantiene a la proteína en el retículo, para que sufra las correspondientes modificaciones postraduccionales. Una oxido-reductasa del retículo, Ero1- α , interviene en la formación de los enlaces disulfuro en adiponectina, también se une a ERp44 y compite con la adiponectina, lo que permite la su liberación (11). Otra oxido-reductasa que

interviene en la multimerización de la adiponectina es DsbA-L, también es conocida por GST-kappa, que es muy abundante en tejido adiposo y no se ha visto implicada en la secreción de otras adipoquinas (12).

En condiciones fisiológicas, se encuentra en el suero en concentraciones entre 5-10 µg/ml (13) representando en torno a un 0,01% de las proteínas totales en suero. En situación de obesidad, estos valores disminuyen. Existe un dimorfismo sexual en cuanto a los niveles en suero de adiponectina (14). Los valores medidos en suero de hombres son significativamente menores que en mujeres (15). Se ha visto que las hembras de ratón presentan unas 2,5 veces más de adiponectina en suero que los machos. Además, en machos la forma mayoritaria la MMW y en hembras existe una distribución similar entre MMW y HMW. Esto sugiere que los niveles de MMW en hembras y machos son similares y que las diferencias vienen determinadas por los niveles en suero de la forma HMW (14). Además se ha observado que la testosterona reduce los niveles de la forma HMW en suero de ratón (16). Esto podría explicar el dimorfismo sexual existente en cuanto a la distribución en suero de los distintos complejos de la adiponectina.

1.3. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES

La adiponectina endógena secretada por los adipocitos es modificada post-traduccionalmente (17). Su análisis por electroforesis bidimensional muestra que existen diversas isoformas de adiponectina con distintos valores de pI y masas moleculares. Esto es debido a glicosilaciones e hidroxilaciones. Se han identificado cinco residuos de lisina conservados, cuatro en el dominio colágeno (residuos 65, 68, 77 y 101 en humano (18)) y uno en la región variable. Estas lisinas primero se hidroxilan y posteriormente de glicosilan. También se han identificado tres residuos de prolina conservado en diversas especies y que son hidroxilados (71, 76 y 95 en humano). (18).

Todas estas modificaciones post-traduccionales son necesarias para el ensamblaje de las formas HMW (19) aunque por mecanismos todavía desconocidos. Así, la adiponectina generada en bacterias, puede formar LMW y MMW pero no la forma HMW (19). También se ha propuesto que las modificaciones post-traduccionales pueden modular los efectos fisiológicos de la adiponectina; se sabe que la inhibición de la gluconeogénesis en hepatocitos es dependiente de dichas modificaciones (17)

1.4. REGULACION TRANSCRIPCIONAL DE LA ADIPONECTINA

El promotor de la adiponectina presenta múltiples sitios de unión a factores de transcripción (20). PPAR γ y C/EBP α , factores de transcripción claves en la regulación energética, aumentan la expresión de adiponectina actuando conjuntamente (21). Se han identificado dos sitios de unión a C/EBP α en el promotor del gen de la adiponectina (22). En ausencia de C/EBP α , PPAR γ ejerce solo un pequeño efecto en cuanto a los niveles transcripcionales de adiponectina (23). Los SREBPs son una familia de receptores nucleares que responden a los niveles de esteroides (24). La forma SREBP-1c activa la transcripción de genes lipogénicos estimulada por la insulina y su expresión en hepatocitos da lugar a esteatosis mientras que en los adipocitos puede mejorar sensibilidad a la insulina mediante la activación del gen de la adiponectina (20). En situación de obesidad, existen zonas del tejido adiposo en las que hay poca disponibilidad de oxígeno, produciéndose hipoxia que activa el factor de transcripción HIF-1 α que suprime expresión de adiponectina (25). Otros factores de transcripción como son CREB (26) y NFAT (27) también inhiben la expresión de adiponectina. Además de esos factores, existen ciertas citoquinas proinflamatorias, como TNF α e IL-18 que reducen la expresión de adiponectina en situación de obesidad (25). La IL-6, disminuye los niveles de mRNA de adiponectina en adipocitos 3T3L1 (28), aunque en tejido humano no se ha observado tal efecto. Señales producidas en la vía β -adrenérgica también inhiben la expresión de mRNA de adiponectina mediante la activación de PKA (29).

1.5. RECEPTORES

Se han identificado tres receptores específicos para la adiponectina, AdipoR1, AdipoR2 y T-caderina (30). AdipoR1 y AdipoR2 presentan siete dominios transmembrana (31)(32). Su extremo C-terminal se encuentra hacia exterior celular y su extremo N terminal está orientado hacia el interior, por lo que difiere estructuralmente de la familia de proteínas G acopladas a receptor (31). Se ha visto que AdipoR1 se expresa de forma mayoritaria en músculo esquelético y AdipoR2 principalmente en hígado (31). Estos receptores no presentan igual afinidad por las distintas formas en las que se presenta adiponectina. AdipoR1 presenta más afinidad por los monómeros, trímeros y hexámeros mientras que AdipoR2 presenta mayor afinidad por los complejos de elevado peso molecular (31). T-caderina presenta afinidad por HMW y hexámeros pero no por los trímeros (30).

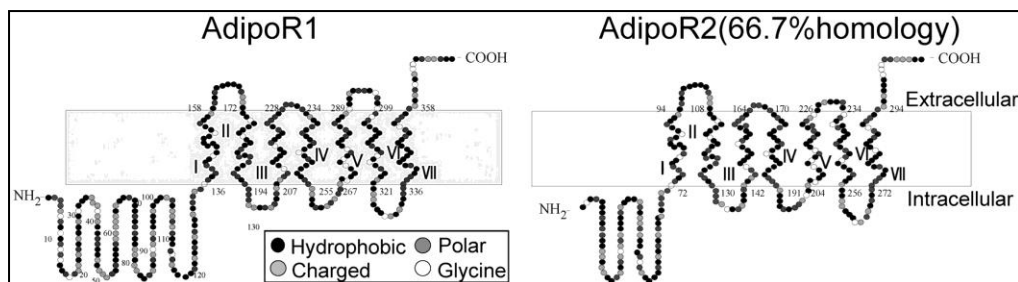


Figura 4: Estructura de los receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2 (32)

1.6. MECANISMOS DE ACCION DE LA ADIPONECTINA

La proteína adaptadora APPL1 interacciona con los receptores de la adiponectina y media en los efectos que esta produce (23). APP1 interacciona con las regiones intracelulares NH₂ de los receptores. La adiponectina ejerce su efecto principalmente mediante la activación de AMPK (33), de MAPK, y PPAR α en músculo esquelético e hígado (31). La activación de estos factores es dependiente de APP1.

La adiponectina provoca la fosforilación de AMPK, activándola. AMPK fosforila ACC y la inactiva (34). Esto lleva a una disminución de malonil-CoA. Aumenta así la actividad de CPT1 y se incrementa la oxidación ácidos grasos (35). Además, el factor de transcripción PPAR α activa genes implicados en la oxidación de ácidos grasos.

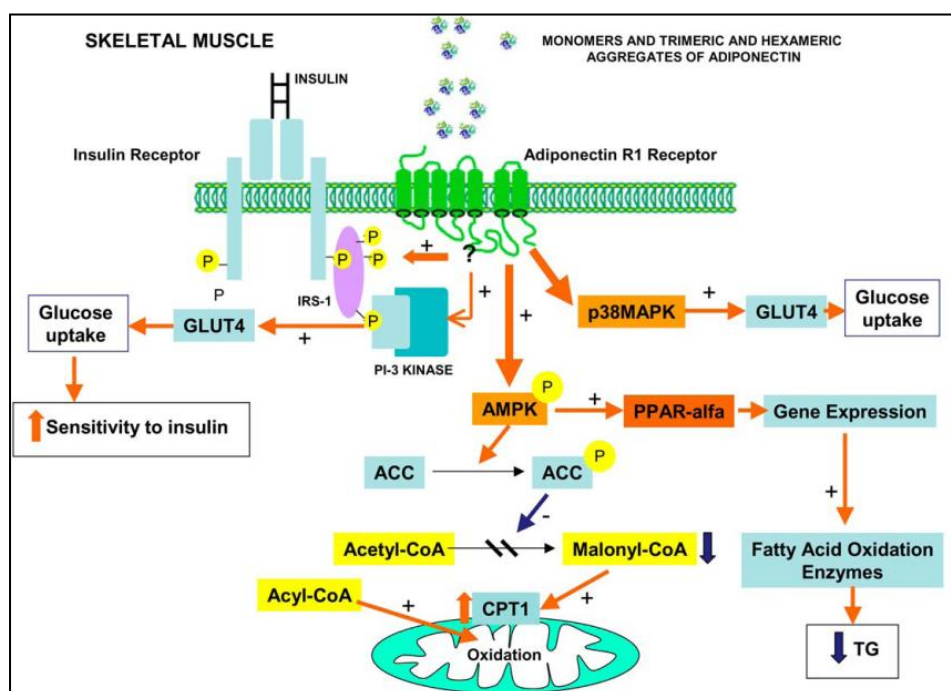


Figura 5: Modelo de acción de la adiponectina en músculo (35)

En hígado, además de esto, se reduce la expresión de PECK y G6Pase (26) que son enzimas implicadas en la gluconeogénesis. Así se reducen los niveles de glucosa in vivo.

1.7. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA ADIPONECTINA

El efecto metabólico de la adiponectina es principalmente a través de la mejora de la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa en el músculo y la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado. Los principales tejidos diana para la adiponectina son hígado (36) y músculo (33), aunque también existe un importante efecto paracrino en el tejido adiposo (37). La adiponectina incrementa la oxidación de ácidos grasos en **músculo** y la captación de glucosa (33). En **hepatocitos**, además de un incremento de la oxidación de ácidos grasos, se inhibe la gluconeogénesis, responsable en parte de la disminución de glucosa en plasma (36). Ratones heterocigotos con déficit de adiponectina (adipo-/+) y ratones homocigotos deficientes en adiponectina (adipo-/-) (38) se ha visto que presentan niveles mayores en suero de ácidos grasos libres y TG.

En el **tejido adiposo** se expresan tanto AdipoR1 como AdipoR2. La sobreexpresión de Adipoq en este tejido provoca un aumento del acumulo de lípidos y una mayor sensibilización a la insulina (37). Una versión de la adiponectina más activa (que presenta una mutación en la posición Cys 39), expresada en niveles muy bajos, produce unos ratones obesos que tiene un peso cuatro veces mayor que los wild-type. A pesar de esta mayor obesidad, son metabólicamente saludables y presentan una reducción de los lípidos circulantes y una reducción del acumulo de lípidos en el hígado (39). La adiponectina media en que la acumulación de lípidos se haga en el tejido adiposo de una manera inocua protegiendo al músculo y al hígado de la toxicidad por depósito lipídico (lipotoxicidad) (40).

1.8. ADIPONECTINA Y DIABETES TIPO 2

La adiponectina es necesaria para activar la cascada de señalización de la insulina (38). Al disminuir su nivel en individuos obesos, disminuye la sensibilidad a insulina (13). Esto conlleva niveles de glucosa y ácidos grasos en suero elevados. La adiponectina es necesaria para mantener unos niveles basales de respuesta a insulina y pequeñas variaciones en los niveles de adiponectina tienen efectos considerables en la sensibilidad a insulina (36). La adiponectina regula la fosforilación del receptor de insulina y su actividad tirosinaquinasa (41). Al suprimir el gen de la adiponectina, se observa una menor fosforilación IRS-1 y un descenso de la actividad de la PI3-K (42) asociado a resistencia a la insulina. Ratones heterocigotos con déficit de adiponectina (adipo-/+) presentan una leve resistencia a la insulina, mientras que los homocigotos deficientes en adiponectina (adipo- /-) presentan una mayor resistencia a la insulina con intolerancia a la glucosa (38). Al inyectar la forma recombinante de la adiponectina, se vio que aumentaba la capacidad que tiene la insulina de suprimir la producción de glucosa en los hepatocitos. La presencia de adiponectina en condiciones fisiológicas maximiza los efectos de la insulina (43) por lo que se sugiere que la función de la adiponectina es sensibilizar al hígado frente a la insulina.

Los niveles de adiponectina en plasma descienden a medida que se va desarrollando obesidad y resistencia a la insulina (44) y se postula que la asociación observada entre bajos niveles de adiponectina y una sensibilidad a la insulina reducida podría ser explicada, al menos en parte, por el aumento de la adiposidad (45). Sin embargo no necesariamente ha de relacionarse obesidad con hipoadiponectinemia y resistencia a la insulina, ya que existen individuos que presentan bajos niveles de adiponectina y resistencia a insulina y no son obesos (46).

1.9. VECTORES LENTIVIRALES

Los retrovirus son RNA-virus que se integran en el genoma de la célula huésped. Los vectores lentivirales, pertenecen a la familia de los retrovirus y derivan del virus de inmunodeficiencia humano (HIV-1). Son capaces de infectar tanto a células que se dividen como a las que no y por este motivo se eligen frente a otros retrovirus. Han sido modificados para infectar a una única célula y tras ello no poder producir más virus, gracias a la eliminación de genes específicos que juegan un papel importante en la capacidad infectiva y la patogenicidad del virus. En el genoma de los lentivirus encontramos las regiones LTR necesarias para la integración en el genoma de la célula huésped. Los genes esenciales para la formación de la partícula viral son *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica proteínas implicadas en la formación de la cápside viral que protege al genoma. El gen *pol* codifica proteínas necesarias para la integración del genoma del virus, como son la transcriptasa reversa y la integrasa. Las proteínas necesarias para la encapsidación del virus y la formación de las partículas virales están codificadas por *env*. Son glicoproteínas y proteínas transmembrana que se encuentran dentro de la bicapa lipídica que rodea al núcleo viral.

En los vectores lentivirales, los componentes esenciales para la formación de la partícula vírica están codificados en distintos plásmidos. Para nuestro trabajo utilizamos tres plásmidos: el **plásmido de transferencia**, **plásmido de encapsidación** y **plásmido de envoltura**. El plásmido de transferencia contiene el gen de interés para la transducción flanqueado por las regiones LTR. Este genoma es el único que es transducido a las células diana. El plásmido de encapsidación codifica las proteínas necesarias para la formación de la cápside que rodea al genoma. Por último, el plásmido de envoltura contiene los genes implicados en la formación de la partícula vírica.

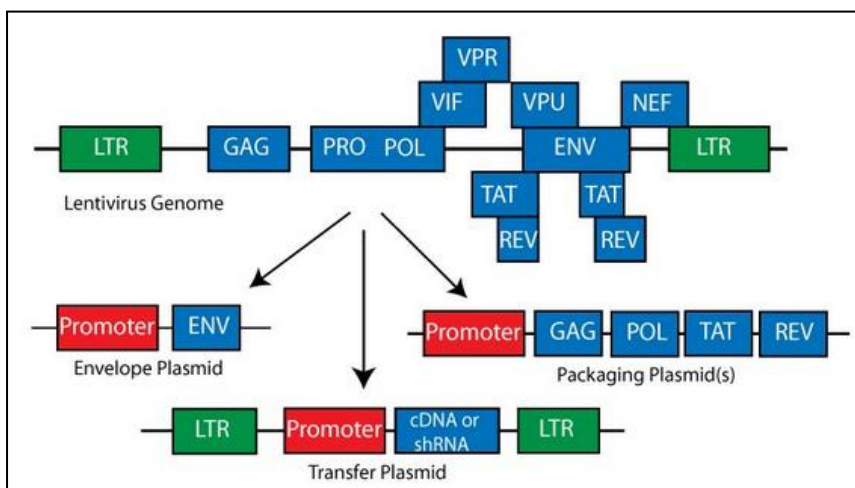


Figura 6. Los genes esenciales para la formación de las partículas virales se redistribuyen entre los plásmidos de transferencia, empaquetamiento y envoltura.

<http://www.addgene.org/lentiviral/packaging/#overview>

2. OBJETIVOS

La adiponectina presenta un papel clave en la homeostasis del organismo. El presente trabajo se centrará en profundizar sobre el efecto de la adiponectina en el metabolismo energético utilizando modelos in vitro con los siguientes objetivos:

1. A partir de su cDNA, se producirá un vector lentiviral capaz de aumentar la expresión de la adiponectina en diversos modelos.
2. Generar líneas celulares de los principales reguladores de la homeostasis energética (adipocitos y miocitos) que sobreexpresen adiponectina.
3. Estudiar los cambios metabólicos asociados a dicha sobreexpresión, especialmente los relacionados con el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina.

3. METODOLOGIA

3.1. Cepa bacteriana y vectores plasmídicos

La cepa bacteriana utilizada para la amplificación de los distintos plásmidos fue la cepa DH5 α de *E.coli* (INVITROGEN). Los plásmidos utilizados incluyen el gen de resistencia a ampicilina, lo que permitió su selección. El medio de cultivo utilizado para su crecimiento fue LB con una concentración de ampicilina de 0,1 mg/ml para la selección de las bacterias transformadas.

Los vectores plasmídicos utilizados fueron:

- pT7T3D-Pacl /Adipoq. Es el vector comercial en el que se clonó el gen de la adiponectina, *Mus musculus* adiponectin (Harvard PlasmID #MmCD00310641)
- pJET1.2/blunt (THERMO SCIENTIFICS). Utilizamos este vector para clonaje intermedio. Este plásmido se comercializa linealizado con extremos romos. Presenta la peculiaridad de que al recircularse sin inserto, expresa un gen letal que impide el crecimiento.
- pWPXLd-IRES-PuroR es el vector de transferencia en el que realizamos el clonaje de la adiponectina. Se obtuvo a partir del vector comercial pWPXLd (Addgene #12258) al sustituir GFP por un casete de resistencia a puromicina.
- psPAX2 (Addgene #12260) es el plásmido de empaquetamiento (packaging plasmid). Se trata de un sistema de empaquetamiento de segunda generación que en un único plásmido tiene los genes *Gag*, *Pol*, *Rev* y *Tat*.
- pMD2.G (Addgene #12259) es el plásmido de envoltura (envelope plasmid). El gen *Env* se ha reemplazado por VSV-G, que codifica para la glicoproteína de membrana y que facilita que la infección se pueda llevar a cabo en diversos tipos celulares

3.2. Líneas celulares modelo

- C2C12 es una línea celular de mioblasto de ratón utilizada como modelo de células musculares ya que, diferencia rápidamente y es capaz de formar miotubos contráctiles y producir proteínas características de músculo.
- 3T3L1 es una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón ampliamente utilizada por su capacidad de diferenciación a adipocitos.

3.3. Medios de cultivo

- Medio cultivo 3T3L1 y 293T: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alto en glucosa (4,5 g/L) , 1mM Piruvato de sodio, 4mM Glutamina, y 10% FBS (Fetal Bovine Serum)
- Medio cultivo C2C12: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alto en glucosa (4,5 g/L) , 1mM Piruvato de sodio, 4mM Glutamina, y 20% FBS (Fetal Bovine Serum)
- Medio diferenciación 3T3L1 (500 μ M IBMX+1.67 μ M Insulina+ 1 μ M Dex+ 10% FBS en DMEM alto en glucosa)
- Medio Insulina 3T3L1 (Insulina 1.67 μ M en 10% FBS DMEM alto glucosa)
- Medio diferenciación C2C12 (2% Horse Serum en DMEM alto en glucosa)
- Medio LB: medio de cultivo líquido de bacterias compuesto por 5 g/L de NaCl, 10 g/L de peptona y 5 g/L de extracto de levadura
- Medio 2xTY, medio rico de cultivo utilizado para la recuperación de las bacterias transformadas. Compuesto por 5 g/L de NaCl, 16 g/L de peptona y 10 g/L de extracto de levadura
- LB sólido, para el cultivo en placa de las bacterias, misma composición que LB líquido más 15 g/L de agar y 0,1 mg/ml de ampicilina

3.4. Primers

Nombre	Secuencia	Utilizado para
mAdipoQ.PmeI-dir	GTTTAAACTGGATCTGACGACACCAA	Clonaje
mAdipoQ.BamHI-rev	GGATCCAAGTCGTTTAAATGAACAAG	Clonaje
pJET1.2 Forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Clonaje
pJET1.2 Reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Clonaje
CHACHI-dir	GGGTACAGTGCAGGGGAAAG	Clonaje
CHACHI-rev	AGATCTCAAGCCTGCCACAC	Clonaje
ActinB-dir	GGCTGTATCCCTCCATCG	qPCR
ActinB-rev	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	qPCR
FASn-dir	GGCTCTATGGATTACCCAAGC	qPCR
FASn-rev	CCAGTGTTTCGTTCTCGGA	qPCR
GLUT4-dir	GTGACTGGAACACTGGTCCTA	qPCR
GLUT4-rev	CCAGCCACGTTGCATTGTAG	qPCR
mACCalpha-dir	ATGGGCGGAATGGTCTCTTTC	qPCR
mACCalpha-rev	TGGGGACCTTGTCTTCATCAT	qPCR
mAdiponectin-dir	GGAGATGCAGGTCTTCTTGG	qPCR
mAdiponectin-rev	CGAATGGGTACATTGGGAAC	qPCR
mCK-dir	CTGACCCCTGACCTCTACAAT	qPCR
mCK-rev	CATGGCGGTCTGGATGAT	qPCR
mMyf5-dir	CTGCTCTGAGCCCACCAG	qPCR
mMyf5-rev	GACAGGGCTGTTACATTGAGG	qPCR
mPDK4-dir	AGGGAGGTCGAGCTGTTCTC	qPCR
mPDK4-rev	GGAGTGTTCACTAAGCGGTCA	qPCR
mCPT1b-dir	GCACACCAGGCAGTAGCTTT	qPCR
mCPT1b-rev	CAGGAGTTGATTCCAGACAGGTA	qPCR

Tabla 2. Lista primers utilizados

3.5. Transformación de las células *E.coli*

La cepa de *E.coli* utilizada, DH5 α ya posee competencia. El método de transformación utilizado consiste en la incubación de las bacterias competentes con el DNA plasmídico resultante de la ligación durante 30 minutos en hielo. A continuación se les somete a un choque térmico que consiste en un minuto de incubación a 42°C y dos minutos en hielo. Tras ello se les añaden 125 μ l de medio 2xTY y se incuban durante una hora a 37°C con agitación. Después se extienden sobre placas de LB con ampicilina (0,1 mg/ml) y se deja toda la noche a 37°C. Los clones resistentes se inoculan en medio LB líquido con ampicilina (0,1 mg/ml) para el posterior aislamiento plasmídico.

3.6. Extracción de los plásmidos.

Los plásmidos se obtuvieron a partir de 7-9 ml de cultivo bacteriano utilizando el kit *Gene Elute Plasmid Miniprep* (SIGMA). La concentración de DNA plasmídico se determinó por absorbancia a 260/280 nm en el nanodrop 2000c de Thermo Scientific.

3.7. Cultivo celular y diferenciación

La línea celular C2C12 se hizo crecer en medio DMEM suplementado al 20% con suero fetal bovino a 37°C y 5% CO₂. Para inducir la miogénesis, el medio de cultivo utilizado fue DMEM suplementado al 2% con suero de caballo.

Para la línea celular 3T3L1 se utilizó medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino a 37°C y 5% CO₂. Para inducir la adipogénesis, el medio de cultivo utilizado era medio de diferenciación para 3T3L1 y tras dos días se cambiaba el medio por medio insulina para 3T3L1, que se mantenía durante dos días más. Tras ello, se seguía utilizando el medio DMEM al 10% en FBS.

La línea celular 293T utilizada para la obtención de virus se hacía crecer en medio DMEM al 10% FBS.

3.8. Clonajes

3.8.1. Subclonaje

Para la amplificación del gen de la adiponectina, Adipoq, se realizó una PCR a partir del plásmido original. Los primers utilizados para ello incorporan secuencias de reconocimiento para las enzimas *PmeI* en el primer directo (mAdipoQ.PmeI-dir) y *BamHI* en el reverso (mAdipoQ.BamHI-rev). La PCR se realizó con la polimerasa de alta fidelidad *Advantage HD Polymerase* (CLONTECH), en el termociclador 2720 Thermo Cycler de Applied Biosystem. El programa de PCR utilizado fue de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 10 segundos a 55 °C y un minuto a 72°C. El producto de amplificación tiene extremos romos. Tras electroforesis del producto de PCR en gel de agarosa, se extrajo la banda del gel y se purificó en columnas de sílice siguiendo el protocolo del kit *GeneJET Gel Extraction* (THERMO SCIENTIFIC). El producto de esta extracción se utilizó para llevar a cabo el clonaje intermedio en el plásmido pJET/blunt, utilizando T4 DNA ligasa (FERMENTAS) y una

incubación de 25 minutos a temperatura ambiente. Se llevo a cabo la transformación en *E.coli* DH5 α y las colonias viables se crecieron en LB líquido con ampicilina. El plásmido pJET/Adipoq se obtuvo usando el kit GenElute Plasmid Miniprep (SIGMA).

Para la comprobación de que el clonaje se había producido correctamente, realizamos una PCR con los primers pJET1.2 Forward y pJET1.2 Reverse. Estos primer flanquean el sitio de clonaje del plásmido pJET/blunt. Obtuvimos un amplicón de 1050pb correspondiente al inserto Adipoq en pJET/blunt.

3.8.2. Clonaje

La digestión del plásmido pJET/Adipoq y del plásmido vector pWPXLd-IRES-PuroR se llevó a cabo mediante una doble digestión con las enzimas PmeI (FERMENTAS) y BamHI (SIGMA). Las condiciones de digestión fueron de 1 hora a 37°C y 20 minutos a 65°C para la inactivación de las enzimas.

Los productos de digestión se separaron en gel de agarosa y fueron extraídos con el kit *GeneJET Gel Extraction*. Los fragmentos de DNA purificados se trataron con la enzima T4 DNA ligasa. La ligación se realizo a temperatura ambiente durante 3 horas. Posteriormente, con esa mezcla de ligación de transformaron las bacterias *E.coli* DH5 α .

Para comprobar que el clonaje se había realizado correctamente, realizamos una PCR con los primers CHACHI-dir y CHACHI-rev, que amplifican la zona entre los sitios de corte de las enzimas PmeI y BamHI. Obtuvimos un amplicón correspondiente a la inserción de AdipoQ en pWPXLd-IRES-PuroR. Para asegurarnos de que el clonaje se había realizado correctamente, llevamos muestras al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). De las muestras secuenciadas, la que presentaba mayor correspondencia con las secuencias de las bases de datos de AdipoQ fue la que utilizamos para la producción de partículas virales.

3.9. Lentivirus

3.9.1. Producción de partículas lentivirales

La línea celular 293T se sembró por duplicado a una densidad celular de $4 \cdot 10^6$ células/ml en placas de cultivo de 10 cm, el día anterior a la transfección. Dos horas antes de la transfección, se añadió a la línea celular 293T medio DMEM con una concentración de $25 \mu\text{M}$ de cloroquina. La mezcla de transfección se preparó con el plásmido de transferencia ($10 \mu\text{g}$), pWPXLd-IRES-puro para el control y pWPXLd-IRES-puro + Adiponectina, el plásmido de empaquetamiento ($6,5 \mu\text{g}$) psPAX2, el vector de envoltura ($3,5 \mu\text{g}$) pMD2.G e IBAFECT ($60 \mu\text{l}$). Toda esta mezcla se lleva a un volumen final de 1 ml (completando con medio DMEM) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la transfección. La mezcla de transfección se añade a los cultivos de 293T y se deja incubando durante 8 horas a 37°C y 5% CO_2 . Pasado este tiempo, el medio de cultivo se sustituyó por DMEM alto en glucosa 10% FBS. A las 48 y 72 horas, se recogió el medio de cultivo, rico en partículas virales, y se centrifugó a 3000rpm durante 5 minutos. Este medio obtenido se pasa por un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ y se reservó este medio que contenía los virus formados para la posterior infección. Los virus fueron conservados a -20°C .

3.9.2. Infección de las líneas celulares C2C12 y 3T3L1

El día anterior a la infección, se sembraron las líneas celulares C2C12 y 3T3L1 en placas de 10 cm y a unas densidades de 2000 células/ cm^2 y 2500 células/ cm^2 respectivamente. Para la infección, se utilizó 1ml del medio con virus más 9ml de medio de cultivo, al que se le añadió $80 \mu\text{l}$ de polibreno. Cada línea celular se infectó tanto con los virus control como con los virus que llevaban el gen de la adiponectina. Al día siguiente se retiró el medio con los virus y se sustituyó por medio normal con puromicina para la selección de las células infectadas. Las concentraciones de puromicina utilizadas fueron de $0,8 \mu\text{g/ml}$ en el caso de las C2C12 y $3 \mu\text{g/ml}$ para las 3T3L1.

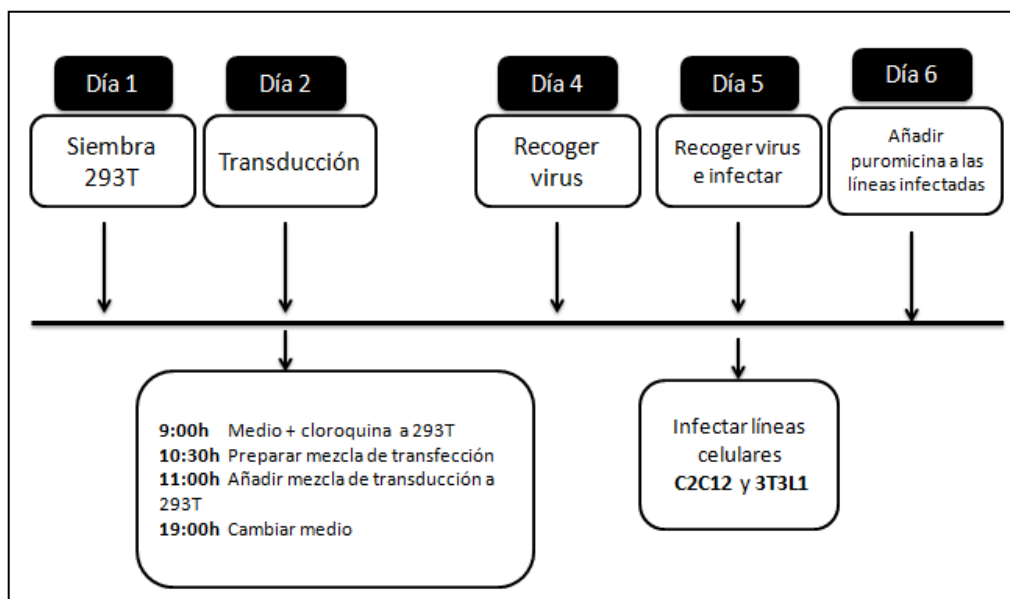


Figura 7. Esquema temporal de las principales etapas de la transducción

3.10. Extracción de RNA total

La extracción de RNA se realizó mediante el uso del reactivo TRI Reagent (TRIZol) (SIGMA), que permite la lisis de las células y la separación de los distintos componentes. A las placas con células se les añadió TRIZol (0,5 ml/10 cm), se recogieron en tubos eppendorf y posteriormente se les añadió cloroformo al 100% (0,2 ml/ml TRIZol), se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 15 minutos a 12000G y 4°C. Así, se obtuvieron tres fases de la que se separó el RNA, contenido en la fase acuosa. Tras ello, se precipitó el RNA con isopropanol al 100% (0,5 ml/ml TRIZol) incubándolo 10 minutos en hielo y se centrifugó 15 minutos a 12000G y 4°C. Tras retirar el sobrenadante, se hicieron lavados con etanol al 75% (1 ml/ml de TRIZol). Finalmente el RNA se resuspendió en agua con dietil pirocarbonato (DEPC) que actúa como inhibidor de ribonucleasas. El RNA se resuspendió en un volumen de 50-100 µl y se determinó su concentración midiendo la absorbancia a 260 nm.

Tras ello se realizó un tratamiento con DNasa (FERMENTAS), para eliminar posibles trazas de DNA contaminante. A 1 µg de RNA, se le añadió 1U de DNasa y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Para la inactivación de la DNasa se utilizó EDTA y se incubó durante 10 minutos a 65°C.

3.11. RT-PCR y qPCR

La retrotranscripción se llevó a cabo según las instrucciones provistas por el fabricante (TAKARA) a partir del RNA obtenido anteriormente con la siguiente mezcla de reacción: 5x PrimeScript Buffer, PrimeScript RT Enzyme Mix I, oligo dT (50 μ M) y random hexamers (100 μ M), en un programa de PCR de 15 minutos a 37°C y 5 segundos a 85°C para la inactivación de la enzima reversotranscriptasa. Con la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado. Además, mediante la detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación, la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. En este caso, la molécula fluorescente empleada como marcador para la PCR a tiempo real es el SYBR Green I (THERMO SCIENTIFICS). La amplificación a tiempo real se realizó con 15 ng de cDNA amplificado con diversos primers, dependiendo del gen a determinar, en el equipo StepOnePlus de Applied Biosystems.

3.12. Extracción de proteínas totales

Para el lisado de las células se utiliza el medio RIPA (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1% Igepal, 0,5 Deoxycolic Acid, 0,01% SDS). Se mantiene 1 hora incubando a 4°C y en agitación. Posteriormente se centrifuga a 15000 rpm durante 5 minutos a 4°C y reservamos el sobrenadante que es donde se encuentran las proteínas. Su cuantificación se realiza mediante *Pierce BCA Protein Assay Kit* (THERMO SCIENTIFIC), que se basa en la reacción de Biuret. Se produce una reacción entre las proteínas y Cu^{2+} en medio alcalino, que da como resultado un compuesto púrpura que se determina espectrofotométricamente a 562nm en el espectrofotómetro Synergy HT de Biotek.

3.13. Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE y Western blot

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

La separación de las proteínas presentes tanto en el interior celular como en los medios de cultivo se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Los geles presentaban dos zonas que diferían en composición. La primera zona se denomina gel concentrador o stacking, al

6% acrilamida y es donde están los pocillos para depositar las muestras. La segunda parte del gel se denominaba gel separador o resolving al 10% de acrilamida. Las muestras a analizar se mezclan con tampón de carga Laemmli buffer (TRIS-HCL 125 mM, Glicerol 40 %, SDS 4%, 0.05 % azul de bromofenol, 10 % de 2-mercaptoethanol pH 6.8, 1x) y se someten a un tratamiento de 5 minutos a 95°C. El tampón de electroforesis tiene una composición de Tris 20mM, Glicina 0,192 M y 0,1% SDS. Las condiciones de electroforesis fueron 10 minutos a 80V y 1 hora a 120V.

Para llevar a cabo el análisis de los diferentes complejos de adiponectina se modificaron ligeramente las condiciones de la electroforesis. Las muestras no se calentaron, se utiliza un buffer de carga no desnaturizante, el gel separador era al 8% de acrilamida y las condiciones de electroforesis fueron de 10 minutos a 80 V y 1 hora y 30 minutos a 120V.

El marcador de pesos moleculares utilizado fue FULL RNG MOLT WT MARKER RAINBOW de Amersham (GE HEALTHCARE).

3.13.2. Transferencia de proteínas a la membrana e inmunodetección

La transferencia de proteínas desde los geles a las membranas de PVDF se realizó bajo unas condiciones de 400 mAmp durante dos horas en una cubeta de electroforesis con el tampón de electrotransferencia (Tris 20mM, Glicina 0,192 M, SDS 0,1% y 10% metanol). En el caso de los complejos de adiponectina, el tiempo de transferencia fue de dos horas y media.

Tras la electrotransferencia, las membranas se bloquearon con TPBS (0.2% TWEEN-20 en PBS 1x) con leche desnatada en polvo al 5% durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron con TPBS (3 lavados de 10 minutos cada uno). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario α -adiponectina (rabbit) (SIGMA #A6354), en una dilución 1/4000 (5 μ l de anticuerpo en 20ml de TPBS) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados con TPBS, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario α - IgG rabbit (Sigma #A6154) en una dilución 1/10.000 (2 μ l de anticuerpo en 20ml de TPBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente y se volvieron a realizar tres lavados con TPBS.

El anticuerpo secundario esta conjugado con peroxidasa y esto nos permitió realizar la inmunodetección con el reactivo comercial *Pierce ECL Western Blotting Substrate* de Thermo Scientific. Las membranas tratadas con ECL se expusieron durante 5 minutos en un film fotográfico para la visualización de la señal.

3.14. Captación deoxi-D-Glucosa tritiada

Para analizar el efecto de la sobreexpresión de adiponectina en la captación de glucosa inducida por insulina, se sembraron y diferenciaron células 3T3L1 y C2C12 en placas de 24 pocillos. A los 7-10 días post-diferenciación las células se incubaron con medio KRPB (NaCl 136mM, 20 mM HEPES, 5mM tampón fosfato de sodio, 4,7mM KCl, 1mM MgSO₄ y 1 mM CaCl₂), 300μl/pocillo durante 90 minutos. Tras ello se añadió insulina a la mitad de los pocillos a una concentración final de 0,5μM/pocillo, manteniendo la otra mitad sin insulina, y se dejó incubar durante 30 minutos más para después añadirles durante 10 minutos el isótopo radiactivo Deoxy-D-glucose, 2-[1,2-³H(N)] (0,15μCi/pocillo) (PERKIN-ELMER #NET549250UC). Las células se lavaron posteriormente dos veces con 300μl/pocillo de medio KRPB para eliminar todos los restos del isótopo y se les añadió 500μl de tampón de lisis (0,2N NaOH 0,1% SDS). El lisado se mezcló con 2 ml de líquido de centelleo Ultima Gold (PERKIN-ELMER) y se determinó la radiactividad con el contador de centelleo 1209 Rackbeta (Wallac). Los resultados se expresaron en cuentas por minuto (CPM).

3.15. β-Oxidación

La β-Oxidación se midió mediante la adición a las células de palmitato tritiado y la posterior cuantificación de ³H₂O en el sobrenadante celular. Este producto marcado surge por acción de las dos deshidrogenasas presentes en la β-Oxidación que remueven el hidrogeno marcado del ácido palmítico. Estos hidrógenos forman agua tritiada al salir al medio. Para ello se sembraron y diferenciaron células 3T3L1 y C2C12 en placas de 12 pocillos. A los 7-10 días post-diferenciación se preparó una disolución 2 mM de BSA (*Bovine* serum albumin) libre de lípidos en PBS+Ca²⁺+Mg²⁺ a la que se le añadió ácido palmítico no radiactivo, para obtener una concentración final de 4 mM, y el isótopo radioactivo ácido palmítico [9,10-³H(N)] (0,5μCi/pocillo de placa P12) (PERKINELMER #NET003005MC). Las células se incubaron durante tres horas con 400μl/pocillo de esta mezcla. Tras ello se reservó la fracción celular y recogió el medio al cual se añadió ácido tricloacético al 10% (400μl/pocillo) para la precipitación de las proteínas. Tras una hora a 4°C se recoge el sobrenadante al que se le añaden 50μl de NaOH para neutralizar el pH. Las muestras se pasaron por una columna donde una resina de intercambio iónico (Dowex 1x2, 200-400 mesh, ACROS

ORGANICS) donde quedó retenido el H₂O marcado. Posteriormente, se eluyó con 500µl de agua miliQ y el eluato se mezcló con 2 ml de líquido de centelleo Ultima Gold (PERKIN-ELMER) y se determinó la radiactividad con el contador de centelleo 1209 Rackbeta (Wallac). Los resultados se expresaron en cuentas por minuto normalizadas por la concentración de proteína medida por BCA en la fracción celular (CPM/mg. Prot)

3.16. Tinción de la grasa de adipocitos

Para ver la cantidad de grasa acumulada durante el tiempo de maduración en las distintas condiciones de cultivo, se realizó una tinción con Oil Red O. (SIGMA #O0625) en 3T3L1 diferenciadas y fijadas con formalina 10%. Posteriormente se lavó con isopropanol al 60% y después se añadió Oil Red O incubando la placa 15-20 minutos en agitación. Por último se lavó la placa cuatro veces con agua y se visualizó al microscopio Nikon Eclipse TS100. También determinamos el contenido lipídico espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 500nm del colorante Oil Red fijado a las placas de cultivo. Para ello utilizamos el espectrofotómetro Synergy HT de Biotek.

3.17. Análisis estadístico

Los valores expuestos en este trabajo se expresaron como media \pm desviación estándar. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de la t de Student y las diferencias se consideraron significativas con una $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención del plásmido de transferencia con el gen Adipoq

A continuación se describe el proceso de clonajes y subclonajes hasta la obtención del plásmido de transferencia que incorpora el gen Adipoq.

4.2. Subclonaje

En primer lugar llevamos a cabo una amplificación del gen de la adiponectina, Adipoq, a partir del plásmido original. Los primers utilizados para ello incorporan secuencias de reconocimiento para las enzimas *PmeI* en el primer directo y *BamHI* en el reverso y se utilizó una polimerasa de alta fidelidad para evitar posibles mutaciones durante la reacción de PCR. El producto de amplificación se utilizó para llevar a cabo el clonaje intermedio en el plásmido pJET/blunt, utilizando T4 DNA ligasa. Tanto el inserto Adipoq amplificado como el plásmido linealizado presentan extremos romos. Con el producto de la ligación se llevo a cabo la transformación en *E.coli* DH5 α . La selección de las bacterias transformadas se realizó gracias al gen de resistencia a ampicilina que incorpora el vector pJET/blunt.

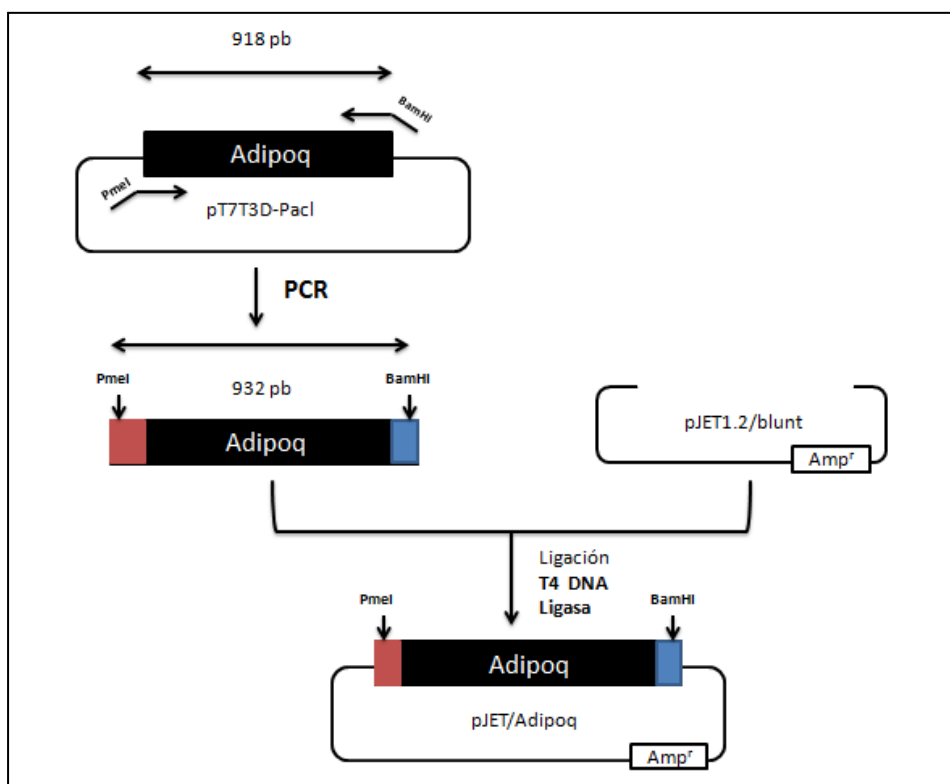


Figura 8: Esquema del subclonaje de Adipoq en pJET/blunt

4.3. Clonaje en el vector de transferencia

La digestión del plásmido pJET/Adipoq y del plásmido vector pWPXLd-IRES-PuroR se llevo a cabo mediante una doble digestión con las enzimas PmeI y BamHI.

Los fragmentos de DNA purificados se trataron con la enzima T4 DNA ligasa. Posteriormente, con esa mezcla de ligación se transformaron las bacterias *E.coli* DH5 α y se sembraron en un medio con ampicilina.

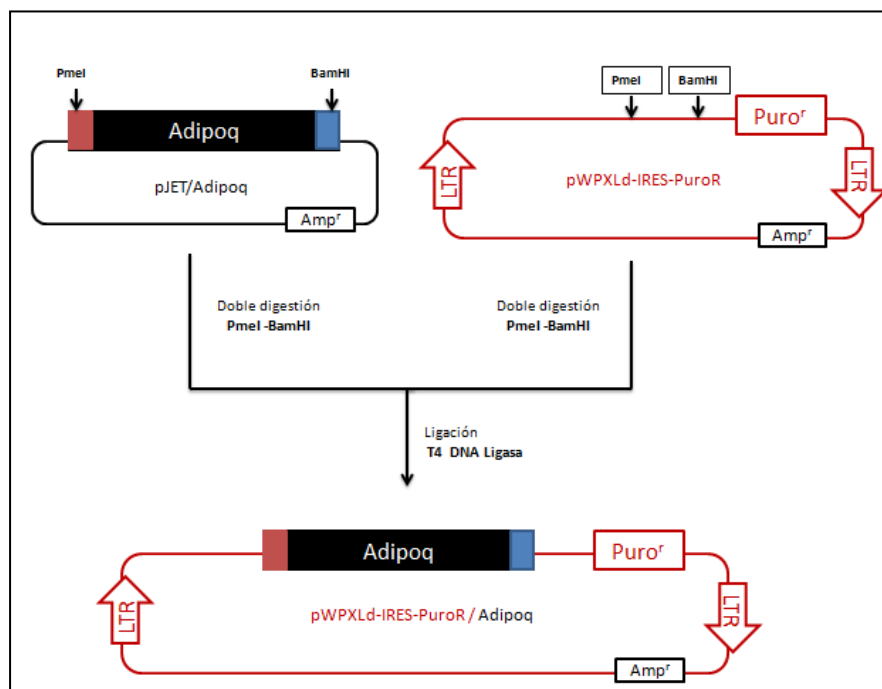


Figura 9. Clonaje en el plásmido de transferencia

Para comprobar que el clonaje se había realizado correctamente, se secuenciaron distintas colonias positivas (resistentes a ampicilina). De las muestras secuenciadas, la que presentaba mayor correspondencia con las secuencias de las bases de datos de Adipoq fue la que utilizamos para la producción de partículas virales.

4.4. Lentivirus

4.4.1. Producción de partículas lentivirales

Se sembraron $4 \cdot 10^6$ de células 293T en placas de cultivo de 10 cm, el día anterior a la transfección. Esto se realiza por duplicado, ya que construimos dos tipos de partículas virales, las que incorporaban plásmido de transferencia pWPXLd-IRES-puroR como control y otro con la construcción con adiponectina. Dos horas antes de la transducción, se añadió a la línea celular 293T medio con cloroquina (25µM). La mezcla de transducción se prepara con el plásmido de transferencia (10µg de pWPXLd-IRES-puroR o pWPXLd-IRES-puroR/Adipoq), el plásmido de empaquetamiento (6,5µg) psPAX2, el vector de envoltura (3,5µg) pMD2.G e IBAFECT (60µl). Toda esta mezcla se lleva a un volumen final de 1 ml (completando con medio DMEM) y se incubaba durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la infección. La mezcla de transducción se añade a los cultivos de 293T y se deja incubando durante 8 horas a 37°C y 5% CO₂. Pasado este tiempo, el medio de cultivo se sustituyó por DMEM alto en glucosa 10% FBS. Dos días después, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 3000rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido (10 ml) se pasa por un filtro de 0,22 µm y se reservó este medio que contenía los virus formados para la posterior infección. A las 293T se les volvió a añadir medio (10 ml) y se repitió la operación de obtención de virus al día siguiente, agrupando los virus recogidos en ambos días (10 +10=20ml). Los virus fueron conservados a -20°C.

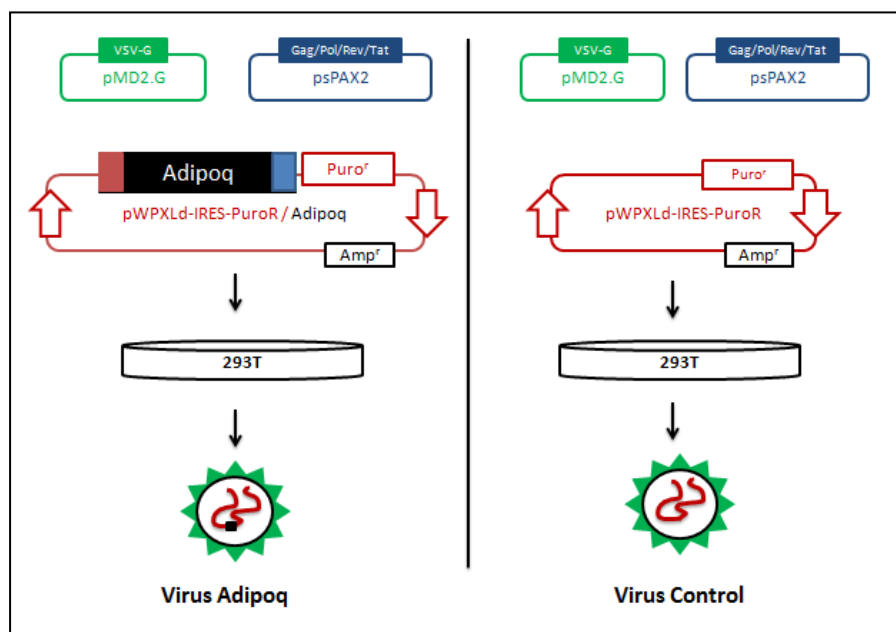


Figura 10. Obtención de partículas virales

4.4.2. Infección de las líneas celulares C2C12 y 3T3L1

El día anterior a la infección, se sembraron las líneas celulares C2C12 y 3T3L1 en placas de 10 cm a unas densidades de 2000 células/cm² y 2500 células/cm² respectivamente. Para la infección, se utilizó 1 ml del medio con virus más 9 ml de medio de cultivo, y polibreno (8 µg/ml). Cada línea celular se infectó tanto con los virus control como con los virus que llevaban el gen de la adiponectina. Al día siguiente se retiró el medio con los virus y se sustituyó por medio normal con puromicina para la selección de las células infectadas. Las concentraciones de puromicina utilizadas fueron de 0,8 µg/ml en el caso de las C2C12 y 3 µg/ml para las 3T3L1.

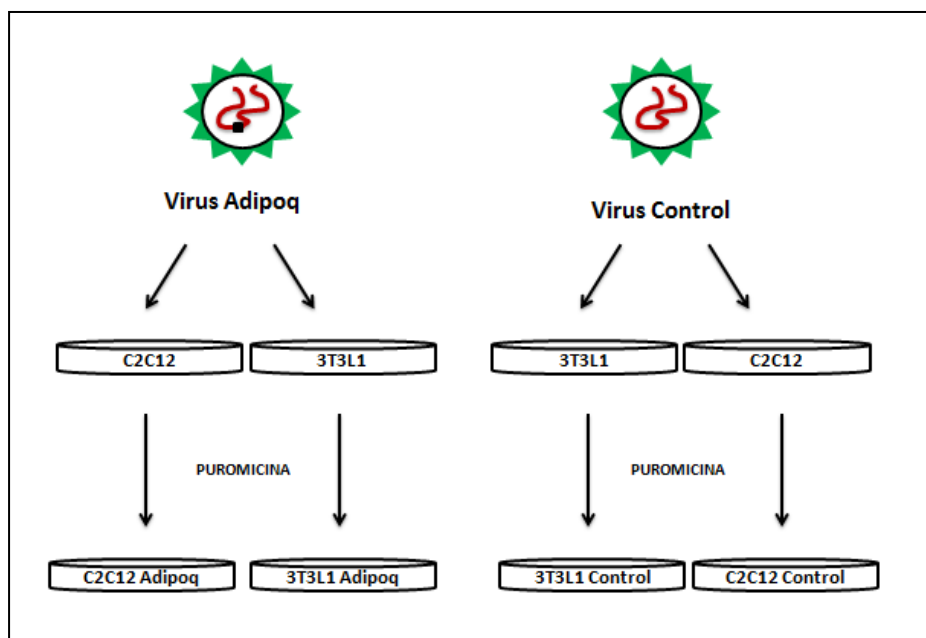


Figura 11.Infección líneas celulares

4.5. Sobreexpresión de adiponectina en 3T3L1-Adipoq y C2C12-Adipoq

Para comprobar la sobreexpresión de Adipoq en las líneas celulares transducidas, se aisló el RNA total de cultivos celulares, tanto de las líneas transducidas con el gen de Adipoq como con el plásmido control. A partir del RNA total libre de DNA y mediante retrotranscripción, se obtuvo un conjunto de cDNAs correspondientes con el transcriptoma de las líneas celulares.

Para comprobar sobreexpresión de Adipoq, realizamos una qPCR utilizando los primers para el gen de la adiponectina. En la Fig12 se muestran la gráfica de amplificación de la qPCR para cada línea celular. Las líneas de color rojo se corresponden con las amplificaciones de muestras de las líneas celulares transducidas con el virus de Adipoq y las líneas verdes se corresponden a las transducidas con el virus control. Como podemos apreciar, en el caso de las 3T3L1, el ciclo al cual se supera el umbral de detección (Ct) en las muestras Adipoq es mucho menor que en el control, aunque el control también produce. En el caso de las C2C12, solo supera el umbral de detección la línea C2C12-Adipoq, ya que las C2C12 no producen adiponectina de forma constitutiva.

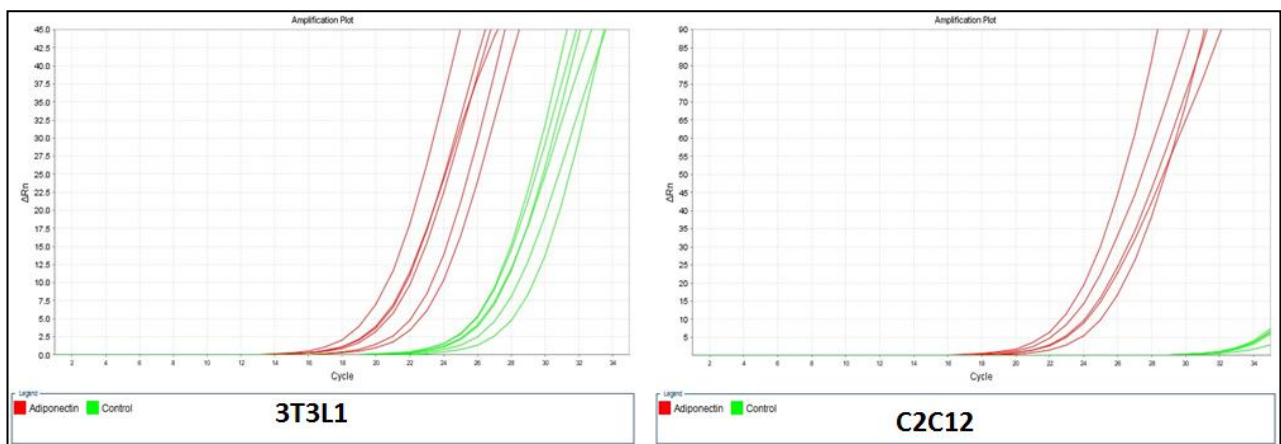


Figura 12. Gráfica amplificación de PCR a tiempo real. El eje vertical representa la cantidad de fluorescencia y el eje horizontal el número de ciclos.

Además de comprobar que se incrementaba la transcripción de adiponectina, comprobamos que se traducía y que se secretaba al medio. Para ello, realizamos una extracción de proteínas totales de las líneas celulares Adipoq y Control y también recogimos el medio de cultivo tras dos días de de incubación con las células. Con las muestras obtenidas realizamos electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes.

La línea celular 3T3L1 es una línea celular comprometida para diferenciarse a adipocitos. Como ya sabemos, la adiponectina es secretada por los adipocitos ya maduros pero no por preadipocitos (47). Para evaluar los efectos de nuestra transfección, realizamos extracción de proteínas tanto en estado de preadipocito (no diferenciado) como de adipocito ya maduro (diferenciado). En la Fig 13 podemos apreciar como la línea celular 3T3L1-Control solo produce y secreta adiponectina en el estado de adipocito (2, 6) y no en estado de preadipocito (1,5). Sin embargo, la línea transducida con Adipoq produce y secreta adiponectina en ambos estadios (3, 4, 7 y 8) y en mucha más cantidad que el control. Hay que destacar que en el estadio de preadipocito, la mayor parte de la adiponectina se encuentra en el interior de las células, como podemos ver en el extracto de proteína citosólica (7) y que secretan solo una pequeña parte. En todos los casos, la señal producida es debida al monómero de adiponectina, ya que hemos sometido a las muestras a un tratamiento reductor y desnaturizante.

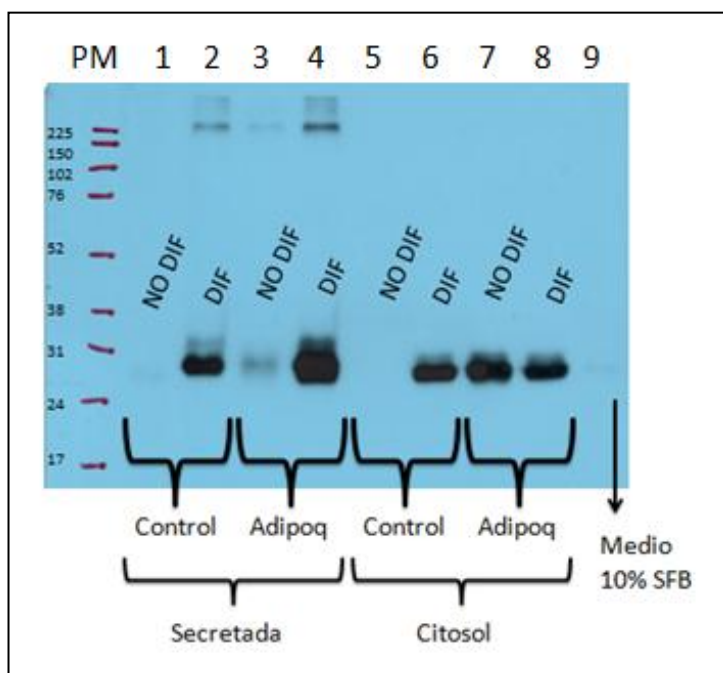


Figura 13. Película de revelado tras 5 minutos de exposición de Western Blot de línea celular 3T3L1. Proteína secretada por 3T3L1-Control sin diferenciar (1), diferenciadas (2), secretada por 3T3L1-Adipoq sin diferenciar (3) y diferenciadas (4). Extracto de proteína total de 3T3L1-Control sin diferenciar (5), diferenciadas (6), proteína total de 3T3L1-Adipoq sin diferenciar (7) y diferenciadas (8). Medio de cultivo DMEM 10%SBF (9).

PM: Marcador de pesos moleculares en kDa

Para evitar posibles interferencias causadas por la adiponectina presente en el medio de cultivo, procedente del suero bovino con el que se prepara, también sometimos a electroforesis una muestra de medio sin haber estado en cultivo con células (9) y no se aprecia señal.

La línea C2C12 crece con mucha rapidez y comienza a diferenciarse espontáneamente a miocitos, por lo que no hemos realizado análisis de la producción y secreción de adiponectina en estadio de fibroblastos, sino solo de miocitos. Analizamos la proteína secretada presente en el medio y la proteína total de los cultivos celulares.

La línea C2C12 no produce adiponectina de forma constitutiva por lo que al transducir el gen Adipoq pretendemos producir una expresión ectópica de adiponectina. En la Figura 14 se muestra los resultados del Western realizado con las muestras de C2C12.

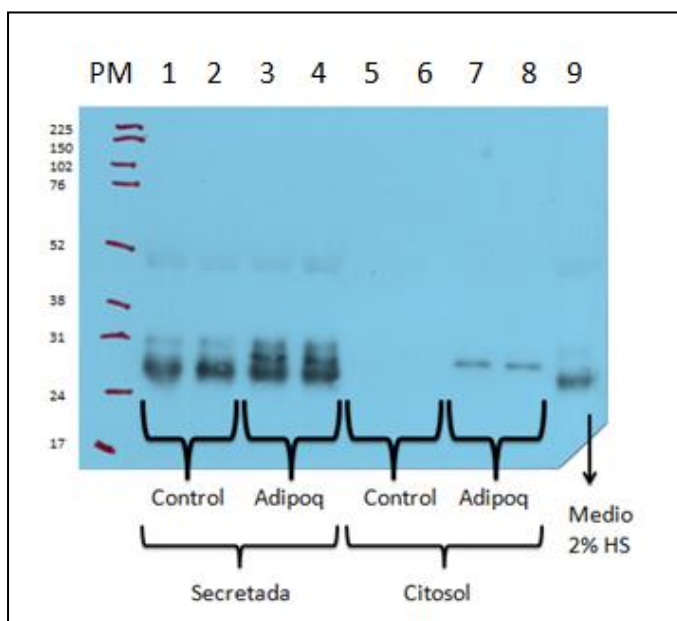


Figura 14. Película de revelado tras 5 minutos de exposición de Western Blot de línea celular C2C12. Proteína en medio de cultivo de C2C12-Control (1 y 2) y en medio de C2C12-Adipoq (3 y 4). Extracto de proteína total de C2C12-Control (5 y 6) y C2C12-Adipoq (7 y 8) Medio de cultivo de diferenciación DMEM 2% Horse Serum (9).

PM: Marcador de pesos moleculares en kDa

En primer lugar hemos de destacar que el anticuerpo utilizado tiene reacción cruzada con la adiponectina de caballo presente en el medio de cultivo e interfiere parcialmente con la adiponectina secretada por las células. El tamaño del monómero correspondiente a la adiponectina de caballo es de un tamaño ligeramente inferior al de la adiponectina transducida, como puede verse al comparar la muestra de proteína citosólica de C2C12-Adipoq (7 y 8) y la señal en el medio (9). Esta ligera diferencia nos permite discernir entre la proteína secretada por C2C12-Adipoq y la presente en el medio. C2C12-Control no presenta adiponectina en el citosol (5 y 6) y las señales que se aprecian en el exterior celular (1 y 2) presentan el mismo patrón que el medio (9). El patrón de bandas que encontramos en el medio de C2C12-Adipoq es distinto al del control,

por lo que las bandas que difieren con el control son las correspondientes a la adiponectina secretada por esta línea celular. Estas diferencias las vemos destacadas en la Figura 15.

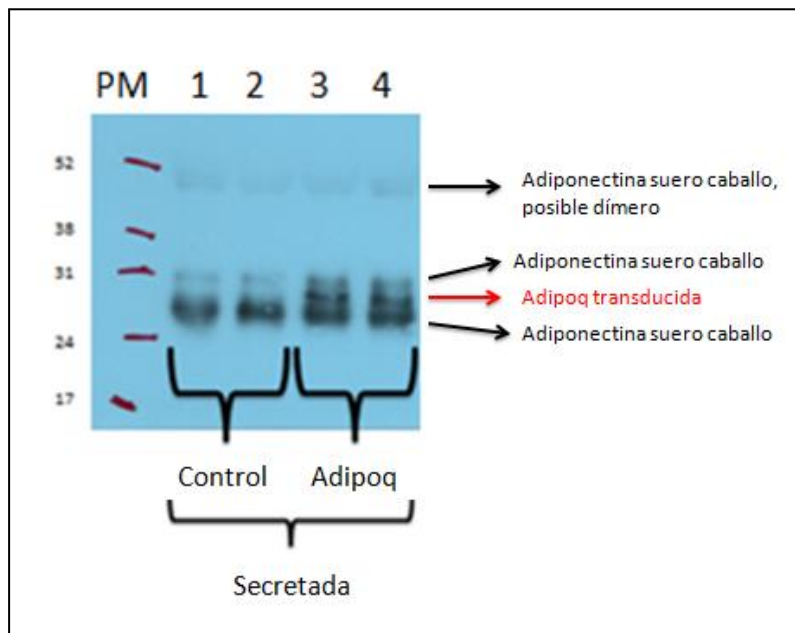


Figura 15. Ampliación Figura 14.

Todas las señales de mayor intensidad se corresponden por tamaño con el monómero de adiponectina, sin embargo, puede observarse una señal muy tenue en las muestras 1, 2, 3, 4 y 9 en torno a 50 KDa que puede corresponderse con algún dímero de adiponectina que no se ha disociado completamente con el tratamiento desnaturalizante.

4.6. Funcionalidad de la adiponectina

4.6.1. Secreción de complejos de adiponectina

La adiponectina se sintetiza como un único péptido, sin embargo, son los diferentes complejos de la adiponectina los que producen los efectos asociados a ella. Por lo tanto, para evaluar la funcionalidad de la adiponectina transducida, hemos de analizar la presencia de los diferentes complejos y su correcta secreción. Con esta finalidad, se recogió el medio de cultivo tras dos días en contacto con las diferentes líneas celulares y se realizó una electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) pero sin condiciones reductoras para evitar la ruptura de los puentes disulfuro entre

monómeros. Utilizamos un tampón de carga Laemmli buffer que no contenía el agente reductor β -mercaptoetanol y omitimos el tratamiento previo de calentar a 95°C antes de someter las muestras a electroforesis.

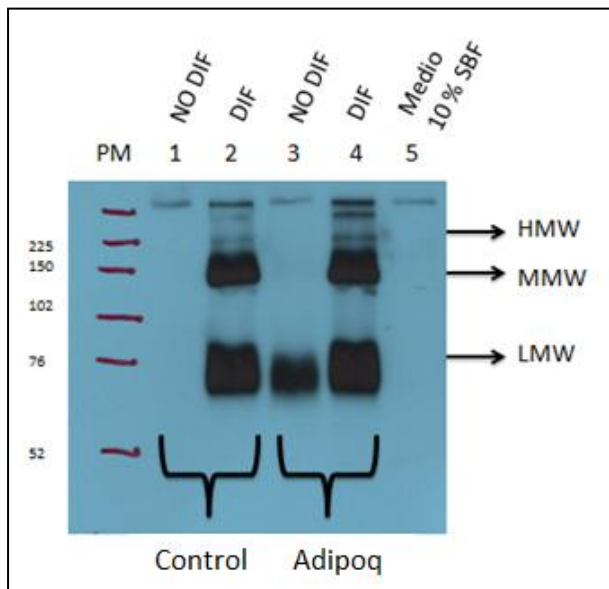


Figura 16. Análisis de los complejos de adiponectina que la línea 3T3L1. Película de revelado tras 5 minutos de exposición. Proteína secretada por 3T3L1-Control en estado de preadipocito (1) , en estado de adipocito (2), por 3T3L1-Adipoq en estado de preadipocito (3) y en estado de adipocito (4). Medio de cultivo 3T3L1

PM: Marcador de pesos moleculares en kDa

En los preadipocitos 3T3L1-Control (Figura 16, línea 1) no se observa la secreción de ningún complejo de adiponectina, resultado esperado ya que tampoco se observaba el monómero en condiciones desnaturalizantes. Una vez diferenciados, la línea celular 3T3L1-Control sí que secreta diversos complejos (Fig 16, línea 2), correspondientes con las formas LMW (trímero), MMW (hexámero) y algunos complejos de mayor tamaño correspondientes con formas de elevado peso molecular, pero con menor intensidad. La línea transducida 3T3L1-Adipoq, secreta adiponectina tanto en estadio de preadipocito (Fig 16, línea 3) y de adipocito maduro (Fig 16, línea 4), pero con una clara diferencia entre ambos. Solo en estadio de adipocito maduro es capaz de secretar complejos superiores al trímero.

También evaluamos la secreción de los distintos complejos en la línea C2C12 (Fig 17). Hemos de tener en cuenta nuevamente la adiponectina presente en el medio y procedente del suero de caballo. El patrón de bandas en C2C12-Adipoq difiere del control. El de C2C12-Control es similar al del medio de cultivo. Tanto en control como en Adipoq pueden apreciarse distintos complejos correspondientes con las formas de medio peso molecular (MMW) y las de bajo peso molecular (LMW). En el caso de C2C12-Adipoq pueden verse bandas adicionales al control que corresponden con complejos formados por la proteína transducida. Estas pequeñas diferencias las podemos ver en la Fig 21 que es una ampliación de la Fig 20.

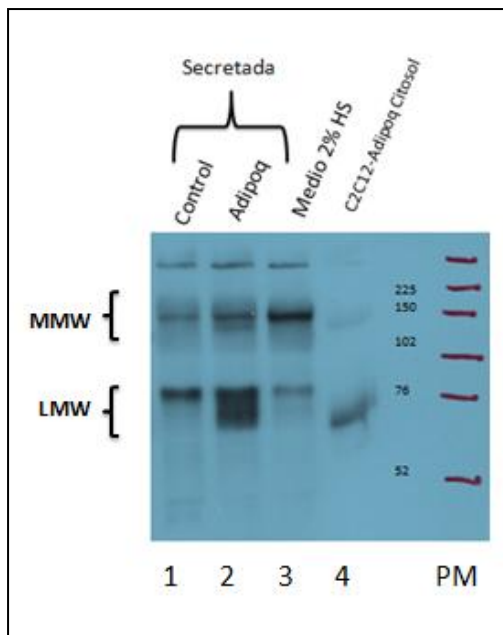


Figura 17. Análisis complejos adiponectina de C2C12. Película revelado tras 5 min exposición. Proteína secretada por C2C12-Control (1), por C2C12- Adipoq (2), presente en el medio de cultivo (3) y extracto proteína citosólica C2C12-Adipoq (4).

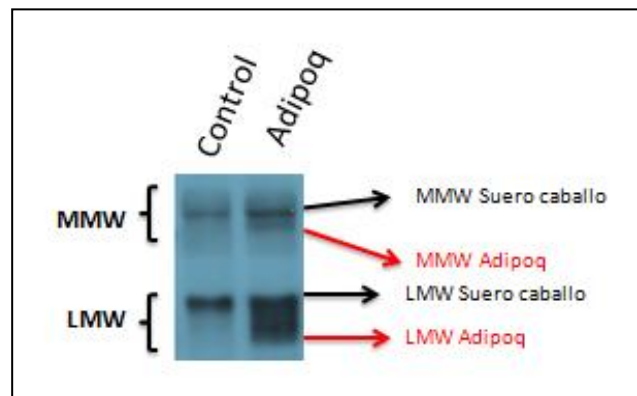


Figura 18: Ampliación Figura 17

Como vemos, al transducir Adipoq en la línea C2C12 no solo se consigue que se produzca la proteína funcional, sino que además se formen y secreten complejos de adiponectina.

Aunque en C2C12-Control y el medio de cultivo se observan las mismas bandas, difieren en cuanto a intensidad. En el medio, es más abundante la forma MMW y en C2C12-Control es más abundante la forma trimérica (LMW). Esto sugiere algún posible mecanismo de disociación de los complejos por parte de las C2C12.

4.6.2. Diferenciación líneas celulares

Otras evidencias de la funcionalidad que la adiponectina transducida presenta, es su efecto en cuanto a la diferenciación de las líneas celulares.

La adipogénesis es un proceso complejo en el que participan numerosos genes. Se caracteriza, entre muchas otras cosas, por la acumulación de lípidos en el interior celular. Esto puede apreciarse visualmente y también con ayuda de un colorante que se une de forma específica con los lípidos. Para valorar la diferenciación de los cultivos, realizamos una tinción con oil red O y visualizamos al microscopio. En la Fig 22 puede apreciarse como en los cultivos de 3T3L1-Adipoq se observan muchos más adipocitos que en el control.

Para cuantificar los niveles de lípidos en cada línea celular realizamos una medida de absorbancia del colorante oil red O a 500nm directamente de las placas. Esto nos permite cuantificar el contenido lipídico en ambas líneas celulares.

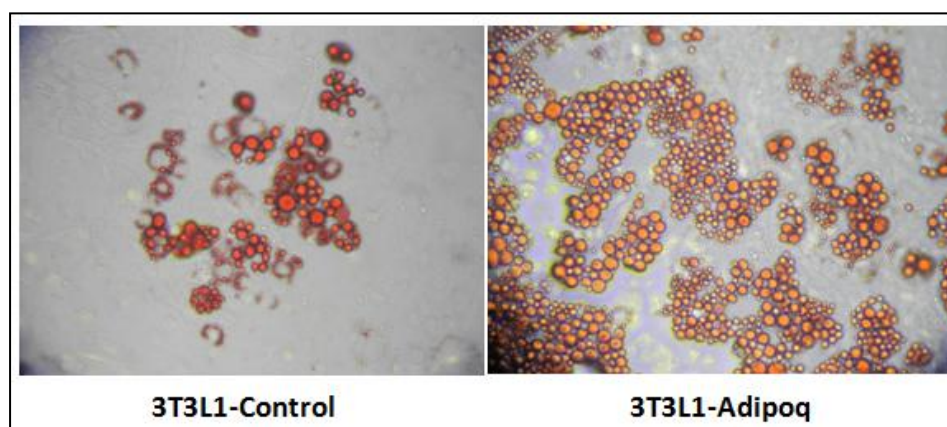


Figura 19: Tinción con oil red O de las líneas 3T3L1-Control y 3T3L1-Adipoq

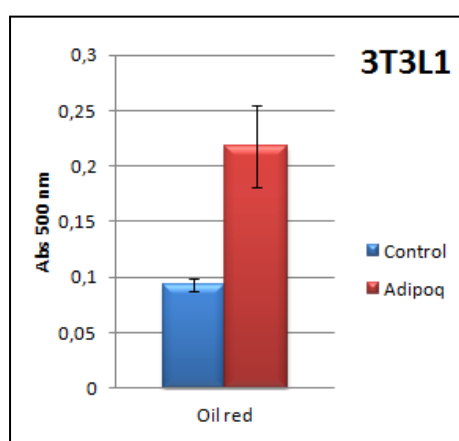


Figura 20: Absorbancia medida a 500nm directamente de las placas de cultivo de 3T3L1-Control y 3T3L1-Adipoq. $p < 0,00001$

Para evaluar la diferenciación en la línea celular C2C12, analizamos la expresión de dos genes que se utilizan como marcadores de diferenciación en miocitos. Estos genes se corresponden con las proteínas Myf5 y creatin Kinasa (Ck). Myf5 pertenece a una familia de proteínas conocidas como factores de regulación miogénica y es esencial en el proceso de miogénesis (48). La enzima creatin kinasa es una enzima que se encuentra en los tejidos musculares y que está implicada en la obtención de energía (49). Mediante qPCR evaluamos los niveles de mRNA de estos dos genes en C2C12-Control y C2C12-Adipoq. Los resultados obtenidos pueden verse en la Fig 21.

La línea C2C12-Adipoq presenta mayores niveles de expresión para ambos marcadores de miogénesis, siendo significativas las diferencias con respecto del control.

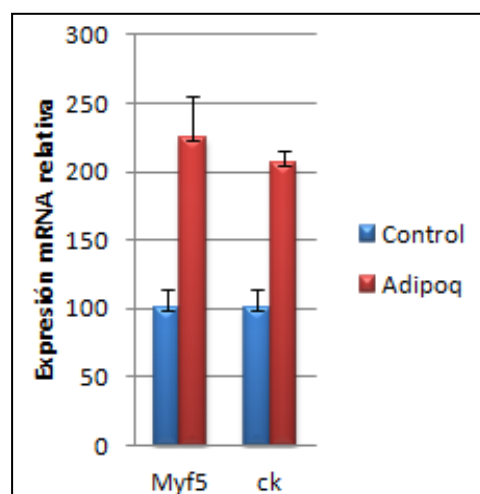


Figura 21 Análisis expresión génica mediante qPCR . Myf5 $p < 0,01$. Ck $p = 0,001$

En ambas líneas celulares, la sobreexpresión de adiponectina provoca una mayor diferenciación.

4.7. Implicaciones metabólicas de la sobreexpresión de Adipoq

Una vez comprobada la funcionalidad de la adiponectina sobreexpresada, realizamos diversos experimentos para evaluar los efectos metabólicos producidos por la sobreexpresión. Evaluamos la capacidad de las distintas líneas celulares en cuanto a la captación de glucosa mediada por la insulina y a la oxidación de ácidos grasos. También realizamos estudios de expresión génica.

4.7.1. Absorción de glucosa

Para evaluar la captación de glucosa por parte de las células se añadió a los cultivos deoxiglucosa tritiada. La deoxiglucosa es un análogo de la glucosa que es transportado por los receptores de forma similar a la glucosa y fosforilado en el interior celular por la hexoquinasa, pero que debido a su estructura ya no puede ser procesada por la célula, permaneciendo en su interior como marcador de la captación de glucosa. Además de evaluar la absorción de deoxiglucosa marcada por las distintas líneas celulares, también analizamos las diferencias producidas en presencia o ausencia de insulina.

En la línea celular 3T3L1, la captación basal (sin insulina en el medio) de deoxiglucosa es similar para el grupo control y el que sobreexpresa adiponectina. Cuando se añadió la insulina al medio, ambas líneas respondieron a los efectos de la insulina incrementando el transporte de deoxiglucosa. Sin embargo, mientras que en el control la insulina provoca un incremento del 20% en cuanto a la absorción de glucosa, en la línea transducida con adiponectina este incremento es del 65% (Fig 22)

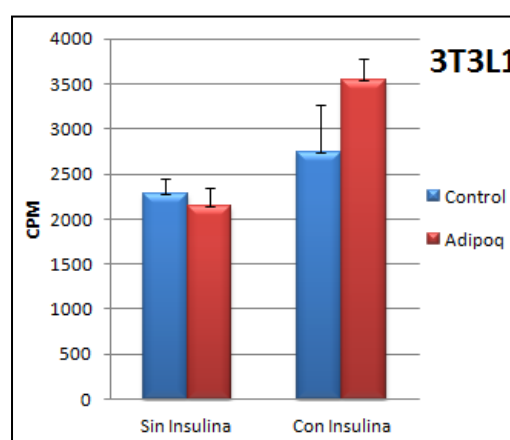


Figura 22. Absorción de glucosa en la línea 3T3L1. Unidades CPM. Sin Insulina $p=0,3$. Con Insulina $p<0,05$

En la línea C2C12, los resultados obtenidos son similares en cuanto la captación basal de deoxiglucosa, así no se observaron diferencias significativas es similar para el grupo control y el que sobreexpresa adiponectina en absorción de deoxiglucosa. Cuando se añadió la insulina al medio se produjo un incremento de en torno al 20% de absorción de deoxiglucosa por parte de la líneas control y de la que sobreexpresa adiponectina. Sin embargo, la diferencia de lo ocurrido en los adipocitos, este incremento fue similar en las dos líneas celulares. (Fig 23).

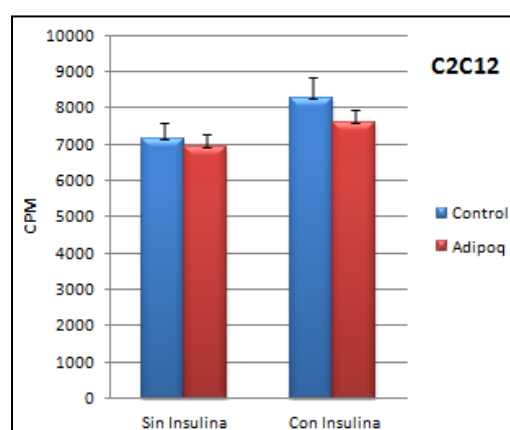


Figura 23. Absorción glucosa C2C12. Unidades CMP. Sin insulina $p=0,3$ y con Insulina $p=0,05$

4.7.2. β -Oxidación

Para analizar el efecto de la sobreexpresión de adiponectina en el metabolismo oxidativo, evaluamos la β -oxidación llevada a cabo por los cultivos durante de 3 horas. Los resultados se muestran en la Figura 24.

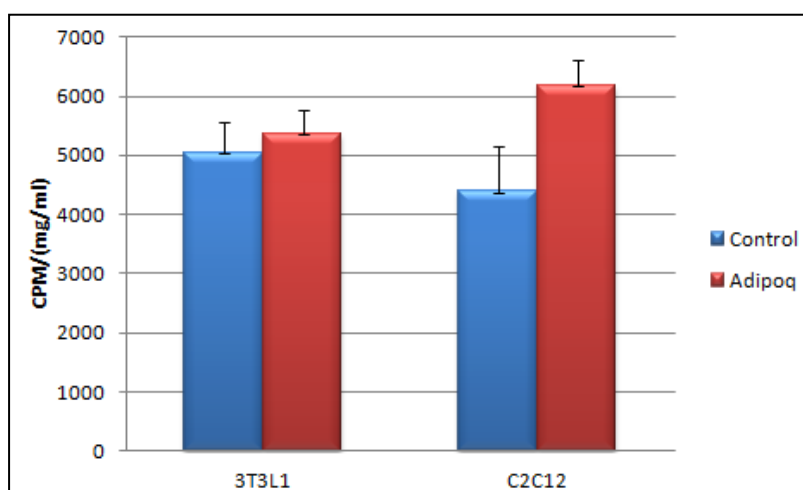


Figura 24. β -oxidación línea celular 3T3L1 ($p < 0,05$) y C2C12 ($p < 0,001$)

En la línea celular 3T3L1, la sobreexpresión de adiponectina no produce un incremento significativo de la β -oxidación y en C2C12 se observa un aumento del 40%. Estos datos están normalizados en función de la cantidad de proteína.

4.7.3. Expresión génica

Para estudiar la influencia de la sobreexpresión de adiponectina en el metabolismo de los hidratos de carbono evaluamos la expresión de los genes Glut4, Pdk4 en adipocitos y células musculares. Glut4 es una proteína transportadora de glucosa regulada por insulina. Pdk4 es la enzima piruvato deshidrogenasa kinasa. Es un inhibidor del complejo piruvato deshidrogenasa que impide la transformación de piruvato a AcetilCoA. Actúa a la manera de un “interruptor metabólico” que desconecta la glucólisis del ciclo de Krebs y desplaza el metabolismo hacia la utilización de grasa, y deja la glucosa disponible para ser utilizada en otras rutas metabólicas.

En nuestros experimentos, además de estudiar diferencias en cuanto a la expresión génica por parte de las líneas control y Adipoq, también quisimos estudiar los efectos de la insulina en cuanto a la expresión de genes en las distintas líneas celulares. Para ello, incubamos las células con una concentración de 0,5 μ M de insulina durante 30 minutos antes de lisarlas para su posterior extracción de RNA. Tras el análisis de los datos obtenidos, no se aprecian diferencias significativas entre las muestras tratadas con insulina y las que no, por lo que agrupamos todas las muestras para evaluar diferencias entre Adipoq y control. En la línea celular 3T3L1, la sobreexpresión de adiponectina viene acompañada de un aumento de los niveles de expresión de Glut4 y Pdk4 (Fig 25).

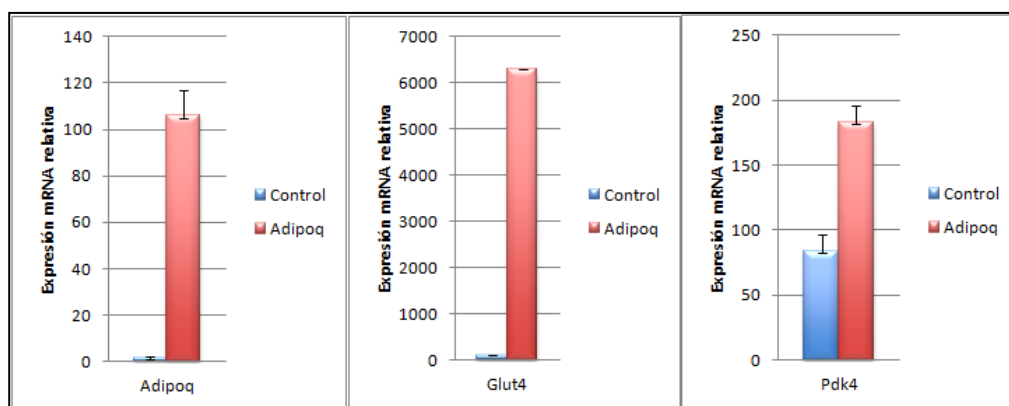


Figura 25. Evaluación expresión génica en 3T3L1 mediante qPCR. $p < 0,01$

En expresión génica también encontramos diferencias en cuanto al efecto de la adiponectina dependiendo de la línea celular. En la línea celular C2C12, la sobreexpresión de adiponectina está acompañada de una disminución de la expresión de Glut4 y Pdk4 (Fig26). Esta disminución es significativa en ambos casos y contrasta con los resultados obtenidos en 3T3L1.

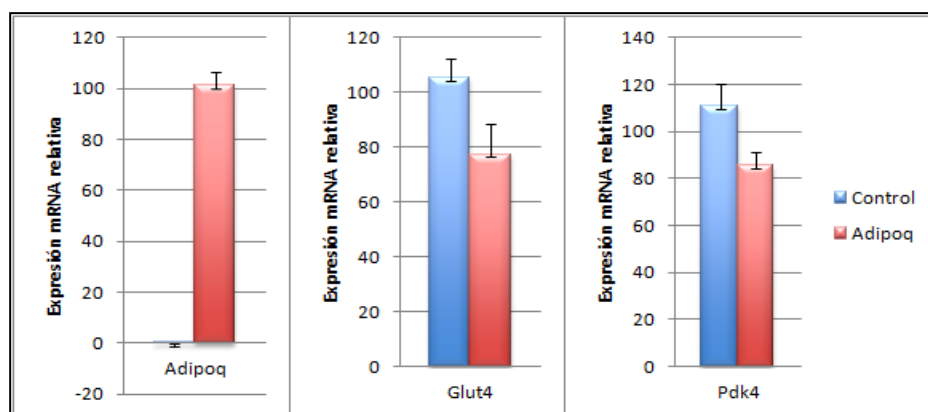


Figura 26. Análisis expresión génica en C2C12 mediante qPCR. $p < 0,05$

En la línea celular C2C12, también evaluamos mediante qPCR la expresión de Fas, ACC y CPT1b (Fig 27). Estas enzimas están implicadas en el metabolismo de ácidos grasos. Su expresión se ve aumentada por la sobreexpresión de adiponectina, pero solo en el caso de Fas y ACC esto resulta significativo.

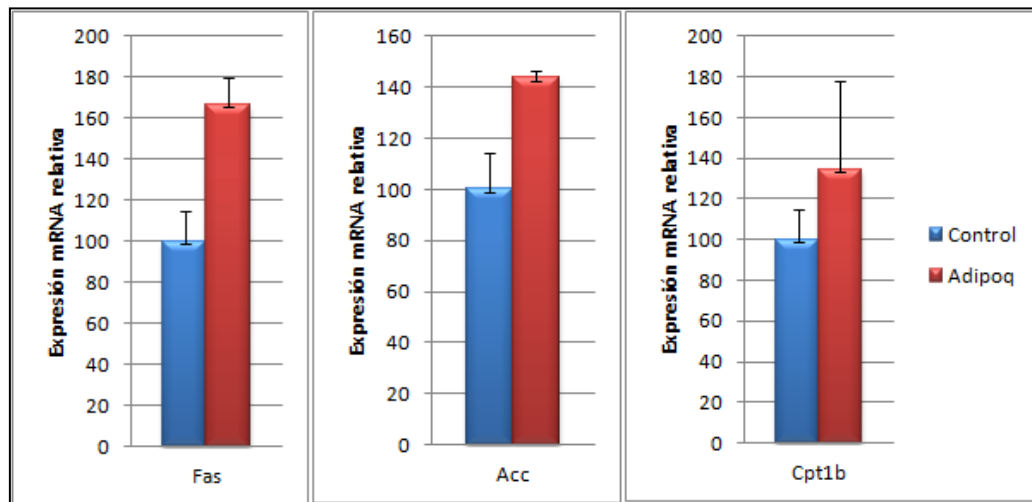


Figura 27. Análisis expresión génica en C2C12 mediante qPCR. $p < 0,05$ en FAS y ACC. $p = 0,5$ en CPT1

5. DISCUSIÓN

La adiponectina es una adipoquina sintetizada por los adipocitos que juega un papel primordial en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. Para este proyecto hemos producido con éxito vectores lentivirales que nos han permitido sobreexpresar la adiponectina en líneas celulares modelos de adipocitos y miocitos. La sobreexpresión de adiponectina ha producido importantes cambios metabólicos en las líneas celulares estudiadas y hemos encontrado que estas modificaciones dependen del tipo celular estudiado.

Aunque la adiponectina es secretada exclusivamente por el adipocito en condiciones normales, estudios recientes señalan su presencia en tejidos no adiposos, tales como el músculo esquelético, en el que se ha detectado la adipoquina dentro de miofibras, tanto *in vivo* como *in vitro* (50) (51), estimándose que entre 1/15-1/175 de la adiponectina circulante podría proceder de la generada en el músculo (51). El estudio de los efectos de la adipoquina secretada por los adipocitos y de los causados por la adiponectina producida en músculo se beneficia de cultivos *in vitro* donde estas diferencias puedan ser modeladas. Además, la utilización de vectores integrativos como los lentivirales supone una herramienta útil para la sobreexpresión de genes de una forma estable, tanto *in vivo* como *in vitro* (52) (53). Una vez que se produce la transducción con el gen de interés, este se expresa de una forma constitutiva. En nuestros experimentos hemos visto que las líneas celulares transducidas, son capaces de producir adiponectina y secretarla. Estos resultados son coherentes con reportes previos donde, mediante el uso de herramientas virales se ha observado sobreexpresión de adiponectina en músculo de ratón produce una proteína funcional, capaz de ser secretada y con efectos a nivel sistémico (54).

La adiponectina circulante forma distintos complejos multiméricos cada uno con efecto distinto sobre los receptores y que causan distintos efectos metabólicos (32). Un resultado novedoso de nuestro trabajo es el hallazgo de que la secreción de los distintos complejos de adiponectina por parte del adipocito depende del estadio en que se encuentre la línea celular. En el estadio de preadipocito, la mayor parte de la adiponectina sobreexpresada se encuentra mayoritariamente en el interior de las células y la que se secreta, lo hace únicamente en la forma trimérica. Solo en estadio de adipocito maduro es capaz de secretar complejos superiores al trímero. Esto es debido a que hay factores implicados en la secreción y formación de los complejos que solo se activan al diferenciarse, independientemente de que se sobreexprese la adiponectina. Uno de estos

factores en la oxido-reductasa Ero1- $L\alpha$. Esta oxido-reductasa media en la formación de enlaces disulfuro en los complejos de adiponectina. Ero1- $L\alpha$ está regulada transcripcionalmente por PPAR γ , factor de transcripción implicado en el proceso de adipogénesis y que tiene su máximo nivel de expresión en adipocitos maduros. Esta es la primera vez que se describe que células musculares también son capaces del ensamblaje y secreción de complejos de adiponectina. Por lo tanto, se plantea la idea de que no solo los adipocitos dispongan de la maquinaria necesaria para el ensamblaje de los complejos de adiponectina y su caracterización debe ser motivo de estudios posteriores.

No todos los complejos de adiponectina presentan la misma afinidad por sus receptores (31). AdipoR1 se expresa de forma mayoritaria en músculo y presenta mayor afinidad por los complejos de menor tamaño de la adiponectina (31). En un estudio sobre la mutación C39S en adiponectina y las implicaciones funcionales que esto tenía, se vió que la proteína mutada solo podía formar trímeros y que ejercía un efecto mucho mayor sobre el musculo que la forma wild-type (8). Así se demostró que la forma trimérica es la que mayor efecto ejerce sobre músculo. En relación a todo esto, nosotros hemos observado que los ratios entre hexámeros y trímeros presentes en suero de caballo se invierten tras estar en contacto con los cultivos celulares (Figura 17). El medio de cultivo utilizado con las C2C12, presenta mayores niveles de la forma MMW de caballo. Al dejar este medio en contacto con los cultivos de C2C12-Control, los niveles de MMW disminuyen y aumentan los de la forma LMW. Esto sugiere algún posible mecanismo de disociación de los complejos. El paradigma actual señala que una vez que los complejos se han secretado, estos no cambian en la circulación (8). Sin embargo un trabajo muy reciente hipotetiza que puede haber conversión entre oligómeros cerca de la superficie celular mediante mecanismos redox (55), de acuerdo con este último reporte nosotros proponemos la existencia en músculo de algún mecanismos de disociación que degrade los complejos de alto peso molecular de adiponectina y permita la interacción más específica del receptor con la forma trimérica.

En la línea C2C12, pudimos observar las diferencias de tamaño que presentan los monómeros de caballo y los de la proteína transducida. Estas diferencias pueden ser debidas a variaciones en el dominio variable según la especie. El monómero de caballo presenta dos isoformas, probablemente debido a modificaciones postraduccionales y el monómero transducido presenta una única isoforma. Al analizar los complejos de adiponectina derivados de la transfección y los procedentes del suero de caballo, vemos que también hay diferencias en cuanto a movilidad. Los

complejos de adiponectina de caballo presentan menor movilidad que los de ratón, al contrario de los que sucede con los monómeros. Esto puede deberse a que los complejos formados en cada especie difieren en cuanto al número de subunidades, como ya se vio que sucedía entre humano y ratón (8) (18).

En cuanto a las implicaciones metabólicas que presenta la sobreexpresión de adiponectina existen diferencias notables en función del tipo celular. La adiponectina ejerce un efecto paracrina en el tejido adiposo (37). Se ha visto que la sobreexpresión de adiponectina en este tejido provoca un incremento de la sensibilización frente a la insulina y un mayor acumulo lipídico. Hemos observado que la sobreexpresión de adiponectina en adipocitos provoca un notable incremento de los niveles de mRNA de Glut4. Sin embargo, esta sobreexpresión constitutiva de Glut4 no genera efecto ninguno en cuanto a la absorción de glucosa en ausencia de insulina. Es solamente en presencia de insulina, donde la absorción de glucosa en los adipocitos que sobreexpresan adiponectina es mucho mayor. Los efectos de adiponectina en cuanto a la sensibilización frente a insulina en adipocitos pueden venir determinados por la sobreexpresión de Glut4. En la línea C2C12 transducida, observamos que la adiponectina provoca una disminución en cuanto a los niveles de Glut4 y el efecto de sensibilización frente a la insulina es similar al control, por lo que en este modelo celular, no se aprecia un incremento en cuanto a los efectos de la insulina con respecto del control. Sin embargo, se ha descrito que la administración de adiponectina in vitro, aumenta el consumo de glucosa con respecto del control a corto plazo y produce una mayor sensibilización frente a la insulina en C2C12 (33). Esto revela un efecto dual de la adiponectina, por lo que se ha de tener en cuenta al proponer a la adiponectina como regulador de determinados desordenes metabólicos.

Otro efecto derivado de la sobreexpresión de adiponectina es la variación en cuanto a transcripción de la piruvato deshidrogenasa quinasa (Pdk4). Pdk4 interviene en la regulación de la actividad de la piruvato deshidrogenasa, que cataliza la reacción del piruvato para dar Acetil-CoA. Pdk4 fosforila a la piruvato deshidrogenasa y la inactiva. En la línea celular C2C12, la sobreexpresión de adiponectina provoca una disminución de la transcripción de Pdk4. De esta forma el piruvato obtenido mediante la glucólisis puede transformarse en Acetil-CoA y permitir la obtención de energía mediante el ciclo de Krebs y posterior β -oxidación. En 3T3L1 la sobreexpresión de adiponectina lleva a un incremento de Pdk4. Este hecho estaría impidiendo el paso de piruvato a Acetil-CoA. Ese piruvato puede convertirse en oxalacetato por acción de la

enzima piruvato carboxilasa. Tras ellos, la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa puede convertirlo en fosfoenolpiruvato y así favorecer el proceso de gluconeogénesis. Esto parece ilógico en las condiciones de cultivo que nosotros hemos utilizado, ya que utilizamos un medio rico en glucosa y no tendría sentido que la célula invierta energía en sintetizarla. Sin embargo, en estas condiciones y con los efectos observados, creemos que en lugar del proceso de gluconeogénesis lo que se está favoreciendo es el proceso de gliceroneogénesis. Ambos procesos comparten muchos pasos, sin embargo, en la gliceroneogénesis, el producto final obtenido sería glicerol 3-fosfato y no glucosa. En este proceso interviene la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, convirtiendo la dihidroxiacetona fosfato obtenida tras varias etapas de la gluconeogénesis, en glicerol 3-fosfato. Este glicerol 3-fosfato es utilizado como esqueleto para la esterificación de ácidos grasos y esto derivar en un mayor acúmulo lipídico como el observado en los adipocitos que sobreexpresan adiponectina. El efecto de incremento de la gliceroneogénesis en tejido adiposo ya se ha observado con los fármacos TDZ, agonistas del PPAR γ . Se ha visto que estos fármacos favorecen la expresión de la isoforma del tejido adiposo de la PEP-CK, incrementando la gliceroneogénesis. Dado que la adiponectina media la acción de estos fármacos (36), pudiera ser que no solo la PEP-CK estuviera implicada en el incremento de la gliceroneogénesis, sino también la Pdk4. Por lo tanto, la sobreexpresión de Pdk4 estaría favoreciendo el acúmulo de lípidos observado en la línea 3T3L1-Adipoq y por tanto la diferenciación.

En miocitos, la sobreexpresión de adiponectina provoca un incremento en la transcripción de Fas y ACC, ambas implicadas en la síntesis de lípidos. Sin embargo, la sobreexpresión de adiponectina en esta línea celular también incrementa la β -oxidación, por lo que de producirse ambos efectos, se estaría dando un ciclo fútil que no es característico de miocitos. Una posible explicación a estas observaciones nos las pueden dar los mecanismos de regulación. La enzima ACC es regulada por fosforilación de AMPK, quien media en los efectos de adiponectina. La ACC fosforilada es inactiva, por lo que aunque se produzca una mayor transcripción, pudiera ser que se encontrara inactiva.

Podemos resumir diciendo que la sobreexpresión de adiponectina presenta un efecto dual en función de la línea celular. Son necesarios más estudios para confirmar el potencial de esta combinación en el tratamiento de desordenes metabólicos, pero la utilización de vectores virales específicos de tejido presenta una gran potencial en el campo de la medicina regenerativa.

6. CONCLUSIONES

- La adiponectina está implicada en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos y los vectores lentivirales son herramientas muy potentes para modificar la expresión de genes y el estudio de sus funciones metabólicas.
- Contrariamente a lo descrito en la literatura, los miocitos son capaces de ensamblar y secretar los diferentes complejos de adiponectina.
- La sobreexpresión de adiponectina produce un aumento de la diferenciación terminal de los adipocitos y miocitos, sin embargo sus efectos metabólicos dependen del tipo celular.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Haslam DW, James WPT. Obesity. *Lancet*. 2005 Oct 1;366(9492):1197–209.
2. Summers S a. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progress in lipid research*. 2006 Jan;45(1):42–72.
3. Van Herpen N a, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiology & behavior*. 2008 May 23;94(2):231–41.
4. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes. Am Diabetes Assoc*; 2006 Jun;55(6):1537–45.
5. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). 1996. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012 Aug 31;425(3):556–9.
6. Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *American journal of human genetics*. 2000 Dec;67(6):1470–80.
7. Williams S. A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1995 Nov 10;270(45):26746–9.
8. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *The Journal of Biological Chemistry. Asbmb*; 2003 Oct 10;278(41):40352–63.
9. Tsao T-S, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, et al. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Dec 12;278(50):50810–7.
10. Qiang L, Wang H, Farmer SR. Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L alpha. *Molecular and Cellular Biology. American Society for Microbiology (ASM)*; 2007 Jul;27(13):4698–707.
11. Wang Z V, Schraw TD, Kim J-Y, Khan T, Rajala MW, Follenzi A, et al. Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. *Molecular and cellular biology*. 2007 May;27(10):3716–31.
12. Liu M, Zhou L, Xu A, Lam KSL, Wetzel MD, Xiang R, et al. A disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) regulates adiponectin multimerization.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008 Nov 25;105(47):18302–7.

13. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*. 2001;50(5):1126–33.
14. Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003 Mar 14;278(11):9073–85.
15. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology*. Am Heart Assoc; 2000 Jun 1;20(6):1595–9.
16. Xu A, Chan KW, Hoo RLC, Wang Y, Tan KCB, Zhang J, et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2005 May 6;280(18):18073–80.
17. Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GJS. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 May 31;277(22):19521–9.
18. Richards A a, Stephens T, Charlton HK, Jones A, Macdonald G a, Prins JB, et al. Adiponectin multimerization is dependent on conserved lysines in the collagenous domain: evidence for regulation of multimerization by alterations in posttranslational modifications. *Molecular endocrinology Baltimore Md*. 2006 Jul;20(7):1673–87.
19. Wang Y, Lam KSL, Chan L, Chan KW, Lam JBB, Lam MC, et al. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006 Jun 16;281(24):16391–400.
20. Liu M, Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd.; 2010 Jan 1;425(1):41–52.
21. Park B, Qiang L, Farmer SR. Phosphorylation of C / EBP ^α at a Consensus Extracellular Signal-Regulated Kinase / Glycogen Synthase Kinase 3 Site Is Required for the Induction of Adiponectin Gene Expression during the Differentiation of Mouse Fibroblasts into Adipocytes. 2004;24(19):8671–80.

22. Segawa K, Matsuda M, Fukuhara A, Morita K, Okuno Y, Komuro R, et al. Identification of a novel distal enhancer in human adiponectin gene. *The Journal of endocrinology*. 2009 Jan;200(1):107–16.
23. Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, et al. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes & development*. 2008 Nov 1;22(21):2941–52.
24. Raghow R, Yellaturu C, Deng X, Park E a, Elam MB. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2008 Mar;19(2):65–73.
25. Zappalà G, Rechler MM. IGFBP-3, hypoxia and TNF-alpha inhibit adiponectin transcription. *Biochemical and biophysical research communications*. Elsevier Inc.; 2009 May 15;382(4):785–9.
26. Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Dentin R, et al. NIH Public Access. 2010;9(3):277–86.
27. Yang TTC, Suk HY, Yang X, Olabisi O, Yu RYL, Durand J, et al. Role of transcription factor NFAT in glucose and insulin homeostasis. *Molecular and cellular biology*. 2006 Oct;26(20):7372–87.
28. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003 Feb;301(4):1045–50.
29. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS letters*. 2001 Oct 26;507(2):142–6.
30. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao T-S, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Jul 13;101(28):10308–13.
31. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. 2003;423(June).
32. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*. 2005 May;26(3):439–51.
33. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine*. 2002 Nov;8(11):1288–95.
34. Tomas E, Tsao T-S, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc CC, Itani SI, et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA

carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Dec 10;99(25):16309–13.

35. Gil-Campos M, Cañete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2004 Oct;23(5):963–74.
36. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006 Feb 3;281(5):2654–60.
37. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of lipid research*. 2005 Jul;46(7):1369–79.
38. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002 Jul 19;277(29):25863–6.
39. Halberg N, Schraw TD, Wang Z V, Kim J, Yi J, Hamilton MP, et al. Systemic Fate of the Adipocyte-Derived Factor. 2009;58(September):1961–70.
40. Asterholm IW, Scherer PE. Enhanced metabolic flexibility associated with elevated adiponectin levels. *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology; 2010 Mar;176(3):1364–76.
41. Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, et al. Phosphorylation, and Low Plasma Concentration Precedes a Decrease in Whole-Body Insulin Sensitivity in Humans. 2002;50(June).
42. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature medicine*. 2002 Jul;8(7):731–7.
43. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama a, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 2001 Feb 27;103(8):1057–63.
44. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature medicine*. 2001 Aug;7(8):941–6.
45. Gao H, Fall T, Van Dam RM, Flyvbjerg A, Zethelius B, Ingelsson E, et al. Evidence of a Causal Relationship Between Adiponectin Levels and Insulin Sensitivity: A Mendelian Randomization Study . *Diabetes* . 2013 Apr 1;62 (4):1338–44.

46. Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin T, Hayden J, Reaven GM, et al. Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes*. 2004 Mar;53(3):585–90.
47. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *The Journal of Biological Chemistry*. Amer Soc Biochemistry Molecular Biology Inc; 1996;271(18):10697–703.
48. Editor S, Mcinnes RR, La S, Ma R. *Developmental Biology : Frontiers for Clinical Genetics The molecular regulation of myogenesis*. 2000;16(14):16–25.
49. Benfield P a, Zivin R a, Miller LS, Sowder R, Smythers GW, Henderson L, et al. Isolation and sequence analysis of cDNA clones coding for rat skeletal muscle creatine kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1984 Dec 10;259(23):14979–84.
50. Staiger H, Kausch C, Guirguis a, Weisser M, Maerker E, Stumvoll M, et al. Induction of adiponectin gene expression in human myotubes by an adiponectin-containing HEK293 cell culture supernatant. *Diabetologia*. 2003 Jul;46(7):956–60.
51. Delaigle a M, Senou M, Guiot Y, Many M-C, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: In vivo and in vitro studies. *Diabetologia*. 2006 Jun;49(6):1311–23.
52. Bainbridge JW, Stephens C, Parsley K, Demaison C, Halfyard a, Thrasher a J, et al. In vivo gene transfer to the mouse eye using an HIV-based lentiviral vector; efficient long-term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium. *Gene therapy*. 2001 Nov;8(21):1665–8.
53. Cao J, Peterson SJ, Sodhi K, Vanella L, Barbagallo I, Rodella LF, et al. Heme oxygenase gene targeting to adipocytes attenuates adiposity and vascular dysfunction in mice fed a high-fat diet. *Hypertension*. 2012 Aug;60(2):467–75.
54. Shklyaev S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Nov 25;100(24):14217–22.
55. Kim J-A, Nuñez M, Briggs DB, Laskowski BL, Chhun JJ, Eleid JK, et al. Extracellular conversion of adiponectin hexamers into trimers. *Bioscience reports*. 2012 Dec;32(6):641–52.
56. Ryan TJ. *Prelude 2 Setting : Endocrinology and Metabolism Seminar ,.* 2007;47–70.