

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



**SÍNTESIS, LIBERACIÓN Y CONCENTRACIONES DE
ADIPOCINAS EN LA RATA A LO LARGO DE LA
GESTACIÓN: SU MODULACIÓN POR LAS HORMONAS
IMPLICADAS EN LA REPRODUCCIÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Sergio Caja Galán

Bajo la dirección de la doctora
M^a Luisa Puerta López

Madrid, 2007

- **ISBN: 978-84-692-0081-0**

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Dep. Fisiología (Fisiología Animal II)



Síntesis, liberación y concentraciones de adipocinas en la rata a lo largo de la gestación. Su modulación por las hormonas implicadas en la reproducción.

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Sergio Caja Galán
Madrid, Septiembre de 2007

Dña. María Luisa Puerta, Profesora Titular del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,

Certifica que: D. Sergio Caja Galán, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), de la Facultad de Ciencias Biológicas de Madrid, el trabajo titulado: “ **Síntesis, liberación y concentraciones de adipocinas en la rata a lo largo de la gestación. Su modulación por las hormonas implicadas en la reproducción**”, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

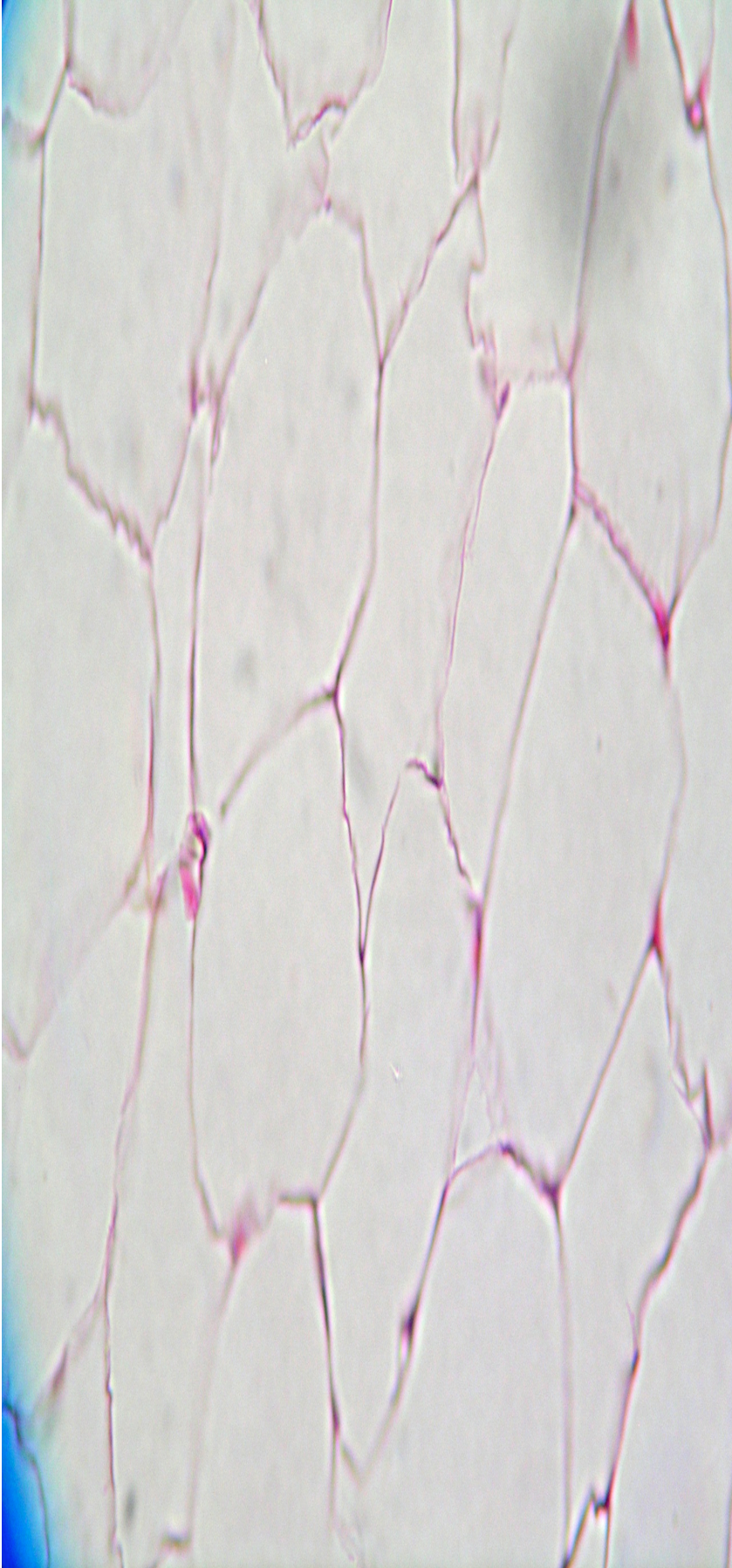
Madrid a 25 de Septiembre de 2007

VºBº Directora

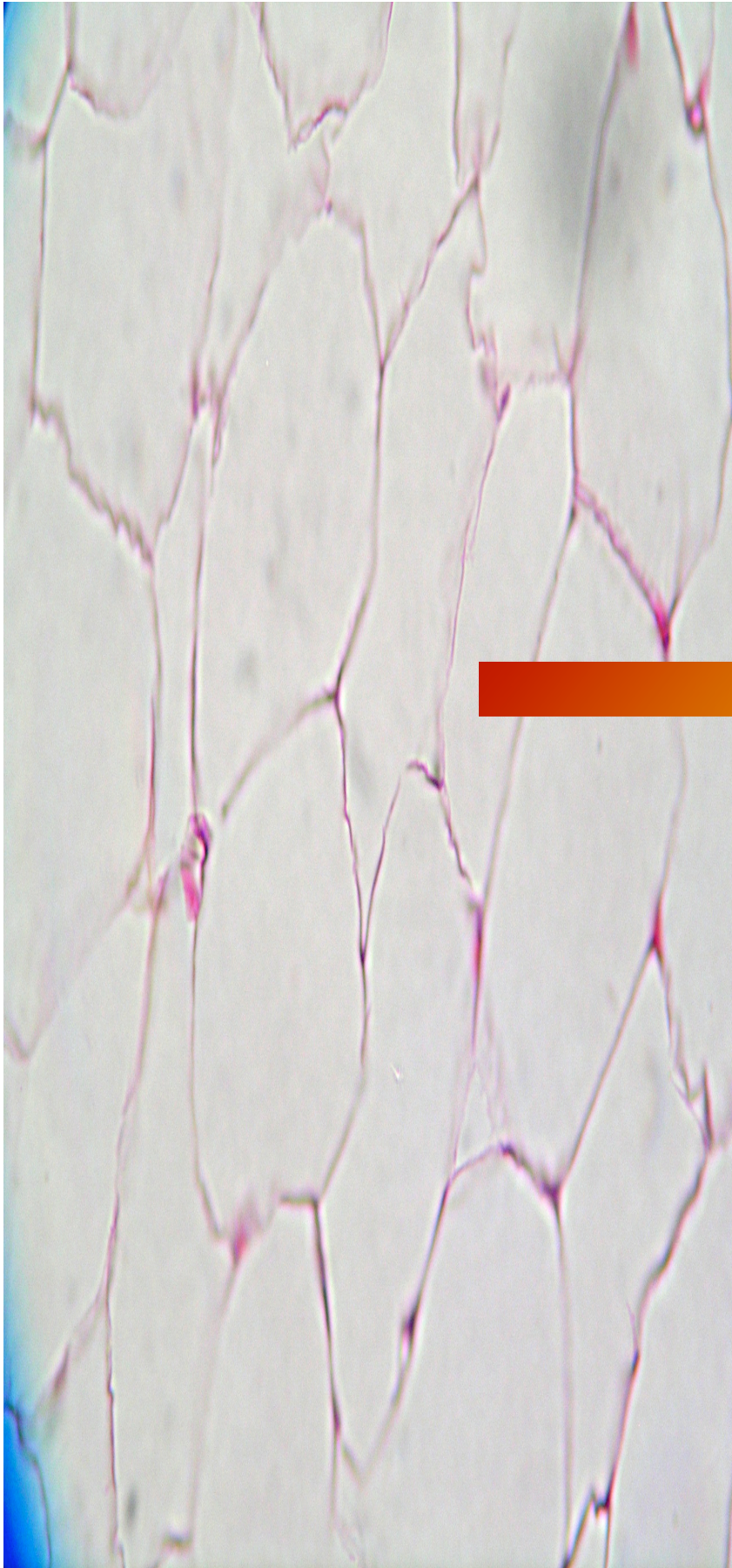
El interesado

María Luisa Puerta

Sergio Caja



**A mis padres Carlos e
Isabel con todo mi cariño**



AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos



Llevo pensando todo el día acerca de los motivos de agradecimiento que me deberían impulsar a escribir este apartado. Resumir cuatro años de la vida de una persona, al menos de su trabajo, se me hace tan difícil, pero lo que si tengo claro es que una buena parte de la gente que está a mi alrededor ha contribuido en parte con todo esto y me veo en la obligación de expresarlo en forma pública. Quiero huir de cualquier clase de convencionalismo a la hora de escribir este apartado. Deseo hacerlo, no por exigencia formal, sino en respuesta a los motivos de mi corazón.

En primer lugar, quiero expresar de una manera profunda y sincera mi agradecimiento a **Marisa Puerta**. Hace tiempo ya que nos conocimos, me impartió una de tantas asignaturas de la licenciatura y desde ese entonces comenzamos a trabajar juntos. Tuvo sitio para mi como investigador en su grupo, pero no sólo eso, sino tiempo para mi formación. Tengo que resaltar varios aspectos que me hacen estarte muy agradecido Marisa. Tu sencillez, tu humildad en la investigación, te hacen, le hacen, una grandísima investigadora. Más que cualquier otra cosa en el mundo, aprecio su sentido realista de su posición dentro del gran esquema y cuadro de la ciencia, sabe donde está, conoce sus posibilidades y recursos y los explota de una manera tremendamente eficiente. Algo que siempre me cautivó de ella fue su manera de trabajar, meticulosa, detallista, exhaustiva, siempre exigente de si misma. ¡Cuanto he aprendido de ti! Por otro lado, se ha convertido como en una especie de segunda madre, al menos en lo profesional. Creo que las buenas prácticas científicas son importantes, pero carentes de un trato personal adecuado, no tienen, al menos para mi, valor en si mismas. Y es que

Agradecimientos

Marisa, tiene una manera de tratar a su gente tan familiar, algunas veces en sus comentarios y apreciaciones podía sentirme como uno de sus hijos, siendo instruido por su madre. Ese trato familiar, creo que ha ido creciendo durante estos años y entre nosotros se han desarrollado verdaderos lazos de afecto. Éste es un motivo de mucho agradecimiento, porque ha hecho que el trabajo sea menos duro, más llevadero. En otros aspectos más técnicos, le debo mucho, mi formación como doctor, la manera de enfocar experimentos y resultados, la financiación de los mismos, la libertad que siempre me ha dado a la hora de trabajar, todo ello se añade a esta pequeña enumeración de gracias. Creo que sin saberlo, elegí a una de las personas más excelentes que he conocido en la universidad y sin lugar a dudas, de comenzar de nuevo la volvería a escoger. Por todo esto y por mucho más, te estaré siempre agradecido y tendrás un hueco especial en mi corazón tanto en lo profesional como en lo personal.

También me gustaría agradecer a otras personas con las que he compartido mi estancia en el laboratorio. Una de ellas es **María Abelenda**, ella me enseñó en su momento ciertos elementos que tenían que ver con el trabajo del laboratorio, por lo que le estoy muy agradecido, además de una multitud de conversaciones agradables sobre lugares exóticos, películas, novelas, gatos y un largo etcétera. Otra persona es **Milagros Rocha**, de ella aprendí mucho durante el año que estuvimos juntos en el laboratorio. Me enseñó, no sólo a tratar con el RNA, sino me mostró de una manera sincera lo que me iba a encontrar durante mis años de doctorado, lo bueno y aquello no tan favorable. A su vez, quiero agradecerle aquellas palabras que tuvo para mi y que plasmó en los agradecimientos en su tesis, ya que sin saberlo ella, tendrían mucha repercusión en mi vida profesional y serían recordadas. No Milagros no, aún sigo teniendo la misma ilusión por la investigación que me instabas a no perder nunca. Otra persona de la que no me puedo olvidar en estos agradecimientos, es de **María Torrente**. Ella se

Agradecimientos

convirtió en una amiga y confidente en lo personal. Juntos, compartimos muchas horas en el laboratorio, de trabajo, de lágrimas, de alegría, en definitiva de todas esas cosas del día a día. De una manera muy especial, quiero agradecerle sus opiniones acerca de mi, el que lea este agradecimiento tal vez no comprenda plenamente a qué me refiero, pero es que las opiniones de María sobre nuestro trabajo en el laboratorio y otras cuestiones fueron como el oasis en mitad del desierto que necesitaba en aquellos momentos, y a día de hoy siguen siendo recordadas. Por último quiero agradecer a **José Luís Pablos** y a mis **compañeros** del hospital 12 de octubre por su apoyo en la recta final de la elaboración de esta tesis.

Agradezco también a mis amigos, en especial a **Dannon Rampton**, **Evelin Manea**, **Sergio Galán** y al resto porque además de ser grandes amigos, siempre me han preguntado acerca de mi tesis, siempre han mostrado muchísimo interés en mis experimentos y en mis resultados.

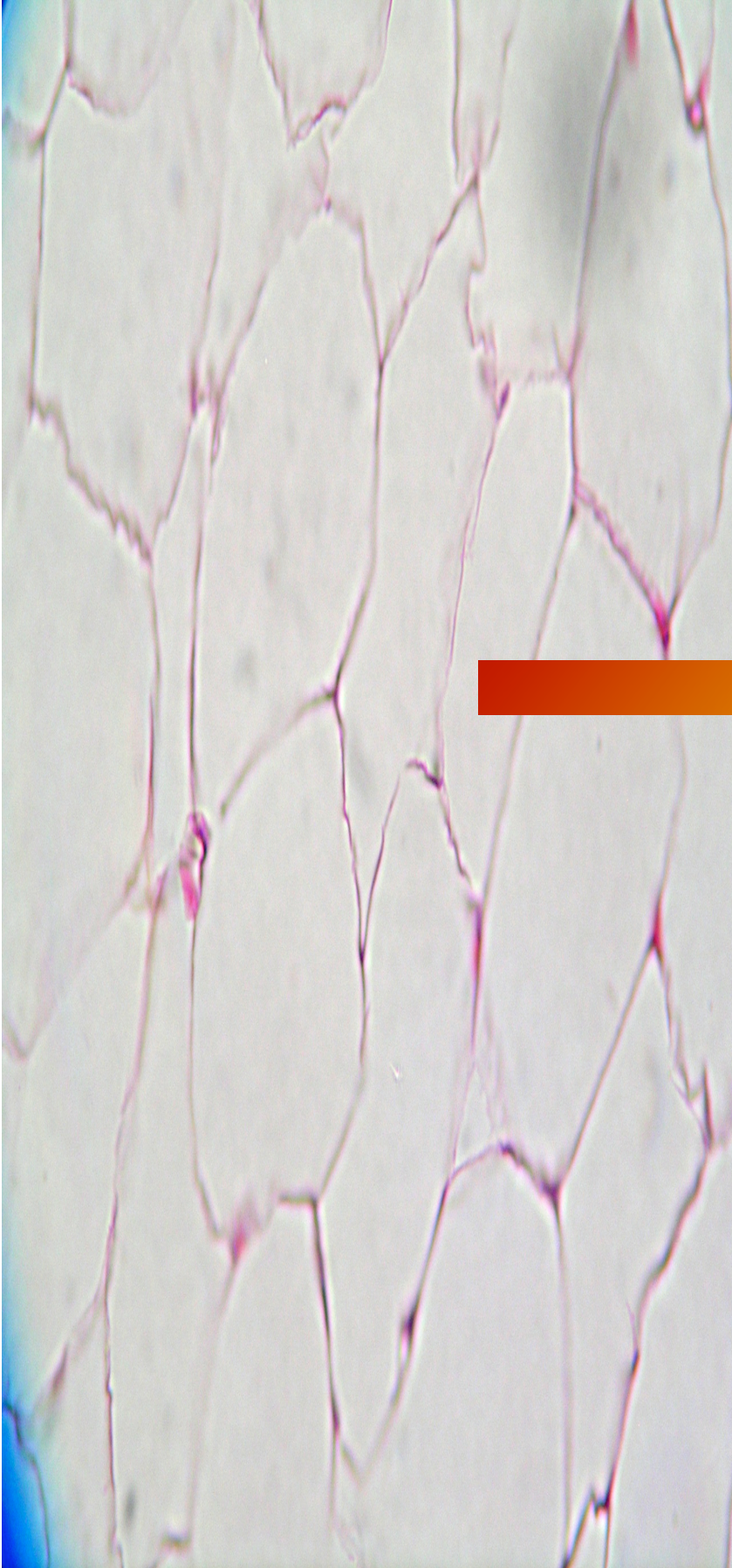
A mis familiares, mis tíos **David** y **Nieves**, **Juan** y **Carmen**, por su interés en mis logros investigadores y porque indirectamente han contribuido en mi esfuerzo personal para que este trabajo esté terminado. En este apartado familiar no puedo olvidar a mis abuelos **Antonia** y **Domingo**. Ellos, vivieron épocas difíciles de la historia, han tenido una vida no fácil y son y serán ejemplo para mí en miles de cosas. He aprendido tanto de ellos a lo largo de mi vida, quizá esta sea mi oportunidad de agradecerles todo aquello, además de por su interés en mi doctorado y en la realización de esta tesis. Mi hermana **Raquel** y mi hermano **Dean**, son y han sido un apoyo en los momentos malos y también en los buenos. Mi agradecimiento para ellos no puede expresarse con palabras y adquirirá su valor en lo futuro. Por último, no puedo olvidarme en este apartado familiar de mis padres **Carlos** e **Isabel** a los que de manera imperativa he tenido que

Agradecimientos

dedicar esta tesis. Yo soy en parte un reflejo de lo que ellos son, de sus vivencias, de sus historias, en definitiva de sus vidas. Gracias a sus enseñanzas estudié, y gracias a su constancia he seguido adelante, en momentos en los que no podía más. Ellos, han pagado mis estudios, no sin esfuerzo y me han mantenido en los duros años de doctorado. Les debo mucho y este trabajo, en lo personal, no habría estado aquí de no ser por ellos.

Sólo me quedan dos agradecimientos más, de gran importancia para mi, en primer lugar a mi esposa **Keren**. Ella supo cautivarme con sus caricias y palabras de ánimo. Siempre ha estado interesada en mi trabajo, en mis resultados, hasta el punto que casi podría doctorarse junto conmigo. Mi vida corre en paralelo a la suya, ella es como mi otro yo, es como ese río de aguas vivas y realmente sin ella no me concibo. Me encantan nuestros planes, me encantan nuestros sueños, me gusta nuestra vida, y compañera siempre te agradeceré por ello. No puedo escribir todo lo que hay en mi corazón para ti, pero una cosa está clara, tu has creído en mi, en mis capacidades, consigues verme como soy. Keren tu me has animado a que esta tesis se escribiera y aquí tienes el resultado, muchas gracias por ello. En segundo lugar, mi agradecimiento más emotivo y especial es para ese **Gran Fisiólogo**, Creador de todas las cosas. Siempre que miro la naturaleza veo su marca y no puedo dejar de emocionarme por ello. Este trabajo le pertenece al igual que mi vida, que mi familia y lo que venga en el futuro será consecuencia de esa decisión de pertenencia, tanto en lo personal como en lo profesional.

Gracias a ti **lector**, por aguantar todo lo que mi corazón tenía que decir, y ahora estamos listos para hablar de ciencia...

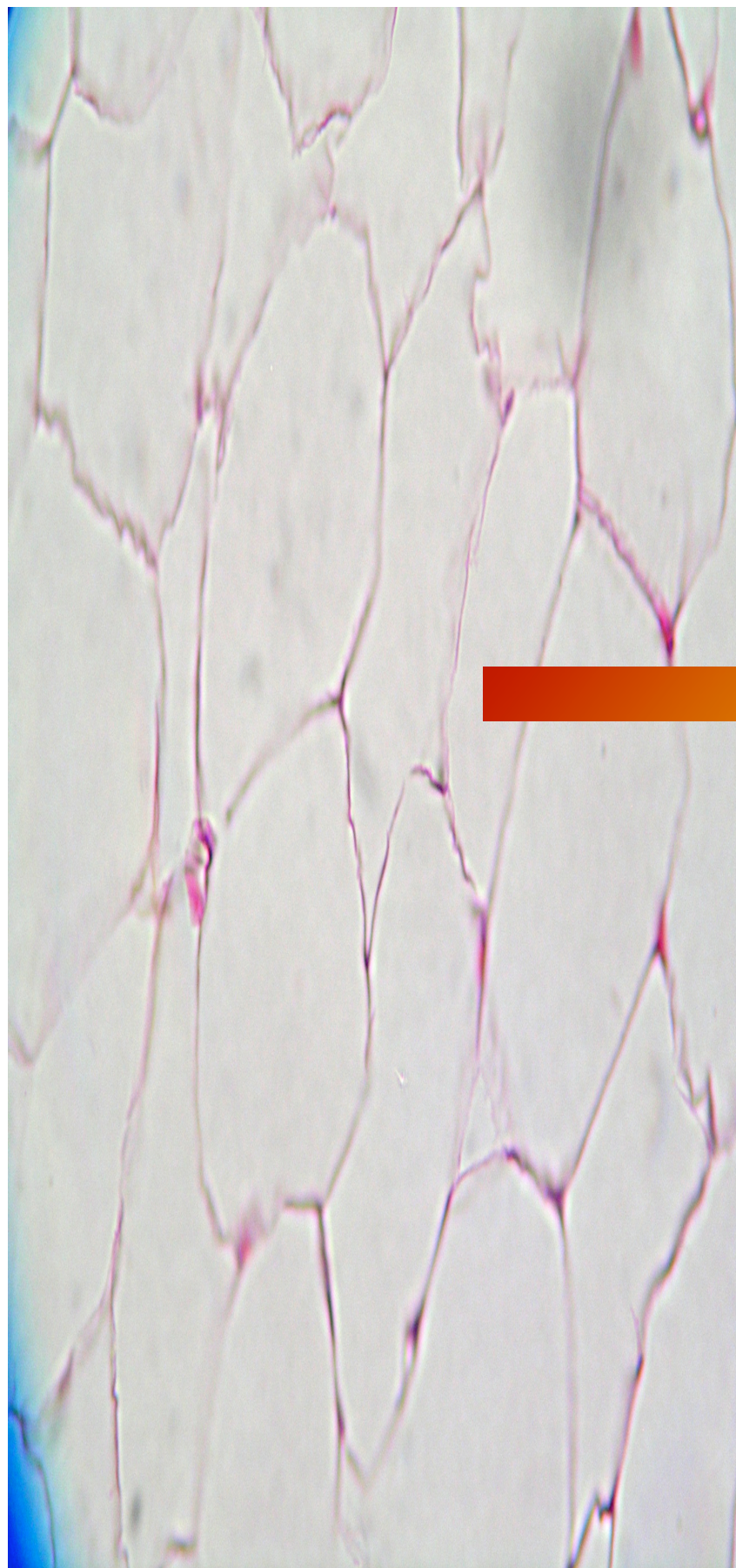


ABREVIATURAS

Abreviaturas



AG	Ácidos grasos
BAT	Tejido adiposo pardo
BMI	Índice de masa corporal
CCK	Colecistoquinina
CSF	Líquido cefalorraquídeo
DIO	Obesidad inducida por la dieta
GF	Glicerol fosfato
GLP-1	Péptido similar a glucagón
hCG	Gonadotropina coriónica humana
IL-6	Interleucina 6
LH/CGR	Receptor de la LH
LPL	Lipoproteína lipasa
OXM	Oxintomodulina
PM	Parametrial
RP	Retroperitoneal
SC	Subcutáneo/a
TG	Triglicéridos
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TZD	Tiazolidinedionas
WAT	Tejido adiposo blanco



ÍNDICE

Índice



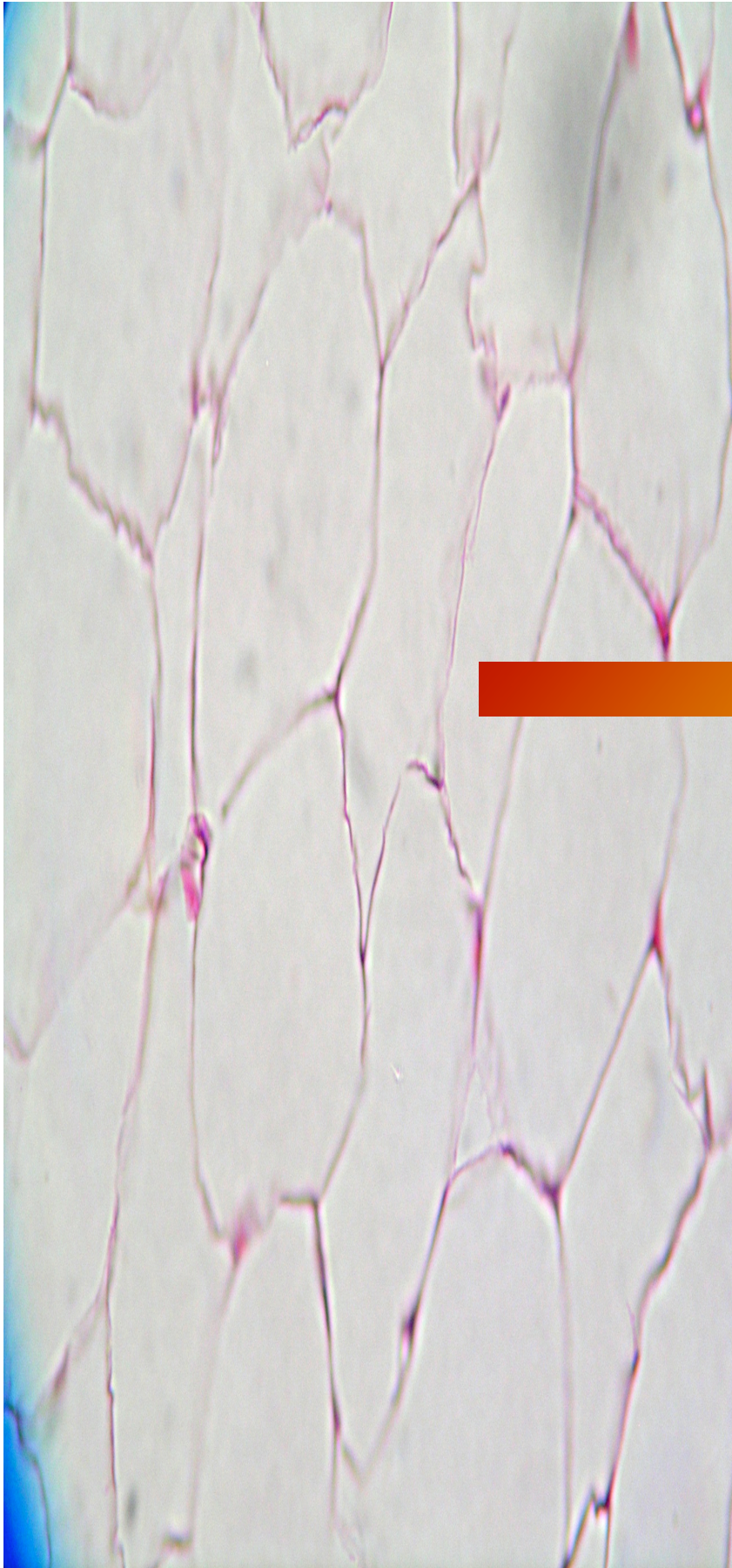
Introducción	15
I. El adipocito: piedra angular del tejido adiposo	17
1.1 La estructura del adipocito	17
1.2 El adipocito, el metabolismo lipídico y la homeostasis de la glucosa	18
1.3 Histología, localización de la WAT y su relación con la actividad metabólica	19
2. El adipocito pardo	21
II. Los adipocitos y el balance energético	25
III. Obesidad y disfunciones metabólicas: La WAT como órgano endocrino	29
1. La adiponectina	31
2. La resistina	35
3. El factor de necrosis tumoral alfa: TNF- α	38
4. La interleucina 6: IL-6	39
IV. La gestación en la rata	42
Objetivos	45
Resultados y Discusión	47
I. Resultados	48

Índice

1.	Expresión y concentraciones extracelulares de la adiponectina durante la gestación	50
	Resumen	50
	Artículo: <i>“Adiponectin values are unchanged during pregnancy in rats”</i>	51
2.	Expresión y concentraciones extracelulares de la resistina durante la gestación	58
	Resumen	58
	Artículo: <i>“Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats”</i>	59
3.	Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas	70
	Resumen	70
	Manuscrito: <i>“ Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas”</i>	72
4.	Modulación de la resistina por parte de las hormonas implicadas en la reproducción	82
	Resumen	82
	Artículo: <i>“Control by reproduction-related hormones of resistin expression and plasma concentration”</i>	84
5.	Síntesis y liberación de la IL-6 y del TNF- α en la WAT, sus concentraciones en el suero y en líquido cefalorraquídeo	90
	Resumen	90
	Artículo: <i>“White adipose tissue production and release of IL-6 and TNF-α do not parallel plasma and cerebrospinal fluid concentrations in pregnant rats”</i>	94
6.	Otros datos no publicados	117
II.	Discusión de los resultados	125

Índice

Conclusiones	140
Bibliografía	143
Adenda: Algunas Reflexiones	174



INTRODUCCIÓN

Introducción



El tejido adiposo, ha sido ignorado durante décadas por la ciencia, considerado como una masa de poca actividad, reservorio de energía a la que se le atribuían pocas características de interés (Mokdad *et al.*, 2003). Dos factores que han contribuido a cambiar esa visión son, en primer lugar el crecimiento en la población de la obesidad, y en segundo lugar, las consecuencias socioeconómicas que genera. Por ejemplo, el 20% de la población en los Estados Unidos es obesa, incluso, presenta índices alarmantemente elevados en edades infantiles (Berthoud, 2006). En España, los datos son menos alarmantes con una prevalencia del 14,5% en la población entre los 25-60 años y del 13,9% en la población infantil y juvenil hasta los 25 años (Perez-Rodrigo *et al.*, 2006). Por otro lado, existe una alta correlación entre el índice de masa corporal y el desarrollo de la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, enfermedad hepato-biliar, osteoartritis y otros desórdenes de carácter psicológico, que aumentan el gasto sanitario y condicionan la calidad de vida (Allender & Rayner, 2007, Mokdad *et al.*, 2003). Todo ello ha sido el detonante perfecto para que en los últimos años se haya incidido más en el estudio del tejido adiposo. Gracias a ello, hoy sabemos que el tejido adiposo es una fábrica de péptidos bioactivos, cuyas funciones son complejas y que en muchos casos no se comprenden del todo. Es por ello que nos detendremos en su biología así como en el estudio de algunos de los péptidos que sintetiza.

Introducción

I. El adipocito: piedra angular del tejido adiposo.

La piedra angular del estudio del tejido adiposo es sin lugar a dudas su unidad básica: el adipocito. Existen dos tipos de adipocitos, los blancos que configuran un tejido denominado grasa blanca (WAT) y los adipocitos pardos que son los constituyentes de la grasa parda (BAT)¹.

1.1 La estructura del adipocito.

Los adipocitos son células poliédricas y relativamente grandes con tamaños entre 10 y 200 μm (figura I). Esta divergencia en su tamaño, se debe a que pueden aumentar su diámetro y por consiguiente su volumen según la cantidad de triglicéridos (TG) almacenados, especializándose por tanto en el almacenaje de las grasas. Esto ocasiona una morfología característica, presentando una gran vacuola lipídica en su interior y un escaso citoplasma desplazado con el núcleo también desplazado (ver figura I).

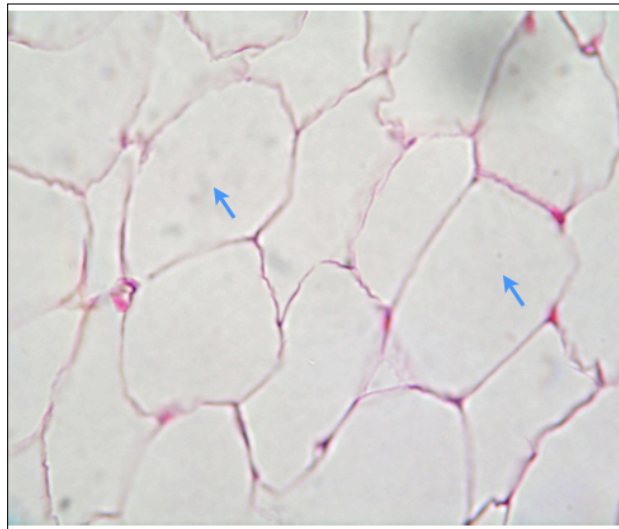


Figura I. Microscopía óptica de tejido adiposo blanco de rata donde se observan adipocitos blancos. En el interior de cada célula se encuentra una gran vacuola lipídica (flecha azul)

¹ En lo sucesivo, a menos que se especifique lo contrario, nos referiremos a los adipocitos blancos y por ende a la WAT.

Introducción

1.2 El adipocito, el metabolismo lipídico y la homeostasis de la glucosa.

Los adipocitos, como ya se ha comentado, están especializados principalmente en el almacenamiento de la grasa. De hecho, aunque otras células pueden acumular lípidos, los adipocitos no sólo los almacenan sino que los liberan de acuerdo con los requerimientos energéticos del resto del organismo y por tanto intervienen de manera activa en el metabolismo (Rosen & MacDougald, 2006). Así, en el adipocito tienen lugar dos procesos del metabolismo lipídico diferentes, a saber, la lipogénesis y la lipólisis. La lipogénesis implica la formación de TG a partir de los ácidos grasos (AG), procedentes principalmente de la dieta y del glicerol fosfato (GF), que se origina como consecuencia del metabolismo glucídico en el adipocito. Por otro lado, la lipólisis implica la degradación de los TG, y como consecuencia la liberación de AG que serán utilizados como combustible por el organismo, (aunque una parte de los mismos puede volver a reesterificarse). A su vez, el GF, durante la lipólisis, abandona la WAT para originar glucógeno por neoglucogénesis.

La glucosa juega un papel activo en la actividad lipogénica del adipocito. La entrada de la glucosa en la célula está mediada por unos transportadores denominados GLUT, de los cuales el más abundante en el adipocito es la isoforma 4 (75-90%) y cuya expresión, está regulada por factores metabólicos, nutricionales y hormonales. La insulina es el estímulo que acelera la entrada en el adipocito de la glucosa por activación de estos receptores (GLUT 4 y GLUT 1- que multiplica por 10 la acción del GLUT 4-), de ahí que en condiciones postprandiales la glucosa sea desviada al músculo y a la WAT. La glucosa en el adipocito será utilizada para originar GF lo que favorece los mecanismos de lipogénesis. Así pues, el resumen del proceso es: como fruto de la inges-

Introducción

ción de alimento, los niveles de glucosa se ven aumentados en la sangre, de tal manera que el páncreas secreta insulina, lo que favorece la captación de la glucosa en el tejido adiposo (10-15% de la captación total - Kahn, 1996, Nelson & Cox, 2005, Pocock & Richards, 2004). Bajo esta perspectiva, la insulina no sólo tiene acciones sobre la glucosa sino también sobre el metabolismo de los lípidos (Yu & Ginsberg, 2005), ya que la glucosa en el tejido adiposo, origina, como ya se indicó, GP. A su vez, en situaciones de exceso de glucosa, ésta se transforma en AG, que se pueden acumular en la WAT en forma de TG y así intervenir en el metabolismo lipídico.

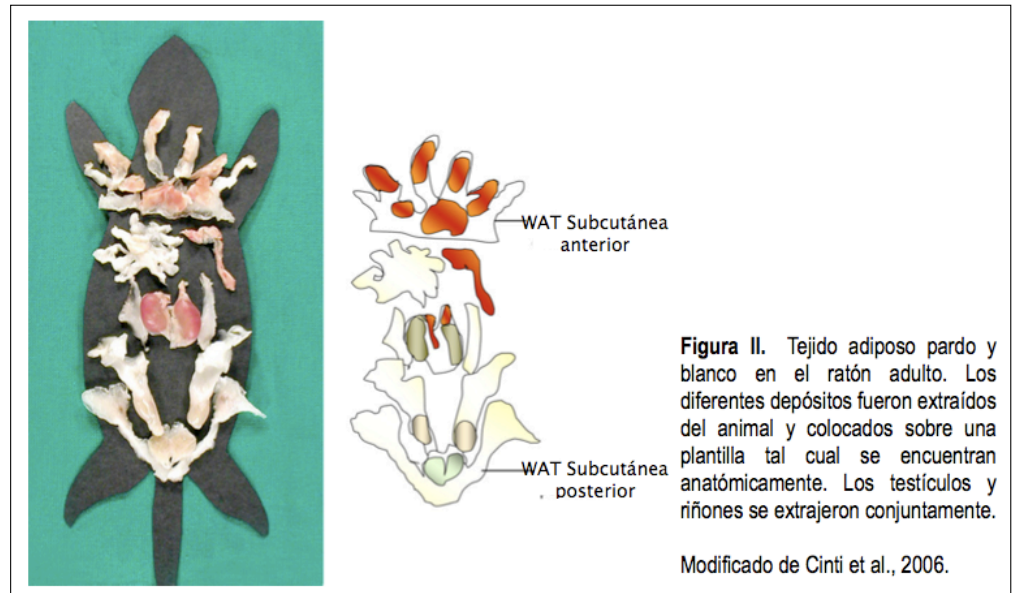
1.3 Histología, localización de la WAT y relación con la actividad metabólica.

Desde el punto de vista histológico, la WAT no está compuesta exclusivamente por adipocitos, aunque éstos son los constituyentes más importantes. En efecto, el 50% del contenido celular total, en la WAT, se debe principalmente a células como fibroblastos, macrófagos o células endoteliales (Trayhurn, 2007). Por otro lado, debido a su intensa actividad metabólica, la WAT está profusamente irrigada por vasos sanguíneos, así como innervada por fibras nerviosas de carácter simpático (Bartness & Song, 2007), aunque inicialmente se sugirió la presencia de fibras parasimpáticas (Kreier *et al.*, 2002), existen evidencias que determinan la no presencia de las mismas (Ballantyne, 1968, Giordano *et al.*, 2006).

La distribución anatómica de la WAT es variable; así, podemos encontrar depósitos en la piel configurando la grasa subcutánea (figura II), - estos depósitos son muy temidos ya que producen la celulitis y se han convertido en la diana de los procedimientos de liposucción -. Existen otros depósitos que ocupan posiciones más internas, nos referimos a la grasa visceral (ver figura II). Estos depósitos viscerales se encuen-

Introducción

tran rodeando a órganos como el intestino, los riñones, el corazón, las gónadas e incluso al rededor del retroperitoneo.

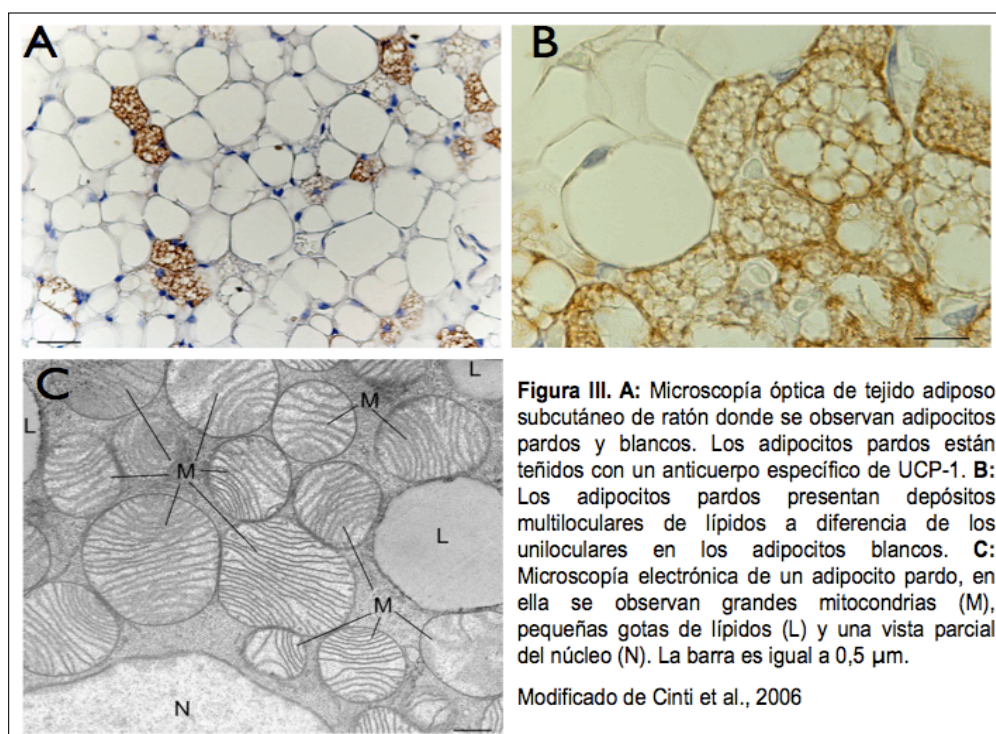


Los depósitos de la WAT no sólo se diferencian en su ubicación, sino también en su actividad biológica y metabólica. En efecto, la grasa visceral presenta una actividad biológica mayor que los depósitos subcutáneos (Giorgino *et al.*, 2005, Virtanen *et al.*, 2002). De hecho, existe una mayor lipólisis (Festuccia *et al.*, 2006, Laplante *et al.*, 2007, Rebuffe-Scrive *et al.*, 1989), producción de quimiocinas y de otros factores hormonales (Thalmann & Meier, 2007), incluso existen diferencias en el potencial replicativo de los adipocitos (Giorgino *et al.*, 2005), en los depósitos viscerales comparados con los subcutáneos. Los mecanismos que se esconden detrás de estas divergencias no están aun claros (Rosen & Spiegelman, 2006).

Introducción

2. El adipocito pardo

La unidad básica de la BAT es el adipocito pardo, que recibe este nombre debido a su color (figura III). Realmente estos adipocitos contienen una gran cantidad de gotas lipídicas de pequeño tamaño (Cinti, 2006), aunque la característica más notable es la existencia en el citoplasma de una gran cantidad de mitocondrias (figura III), (Cinti, 2006). Éstos orgánulos presentan unas proteínas que se han denominado UCP o proteínas desacoplantes de las cuales existen al menos tres diferentes: UCP1, UCP2 y UCP3, (Boss *et al.*, 1997, Fleury *et al.*, 1997, Nicholls & Locke, 1984). Las funciones de las UCP2 y UCP3, diez años después de su identificación permanecen en profunda discusión (Cannon *et al.*, 2006) aunque algunos autores postulan su implicación en la protección frente a las especies reactivas de oxígeno (Duval *et al.*, 2007, Echta y Brand, 2007, Echta *et al.*, 2003, Echta *et al.*, 2002).



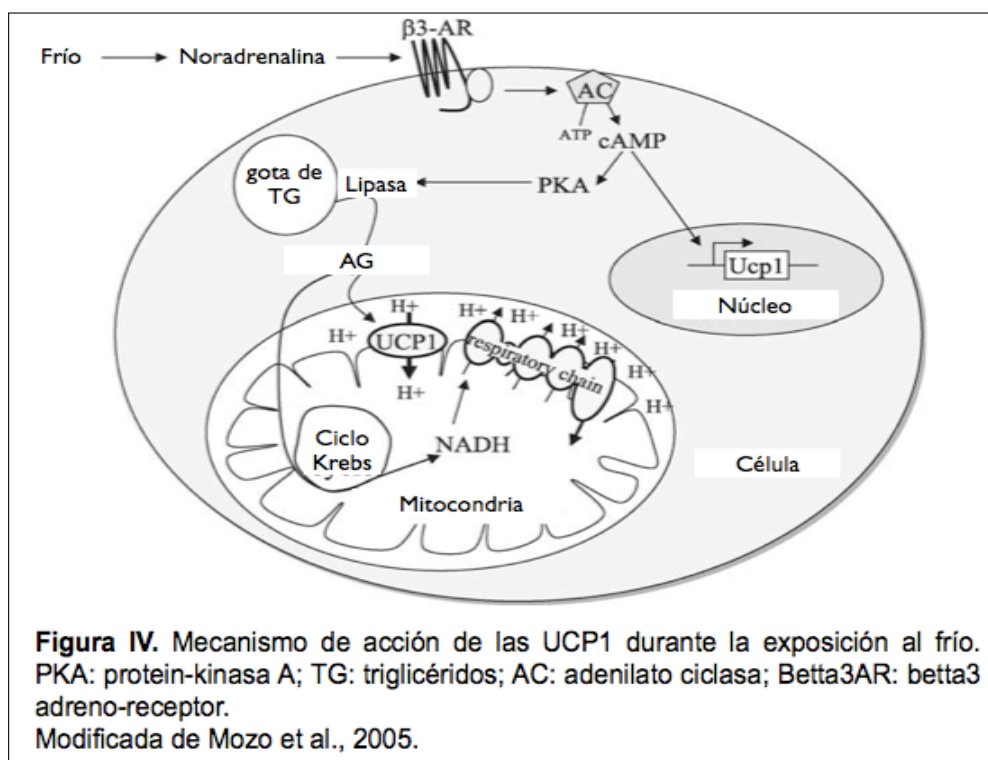
Introducción

La proteína UCP1, sin embargo, es la única de dicha familia que se encuentra exclusivamente en el tejido adiposo pardo (Cannon & Nedergaard, 2004), aunque algunos autores dicen haberla encontrado en el músculo liso (Nibbelink *et al.*, 2001) y en el timo (Carroll *et al.*, 2005), en contradicción con los datos encontrados por los demás autores (Cannon *et al.*, 2006). Esta proteína se describió, por primera vez, en la mitocondria de los adipocitos pardos (Ricquier & Kader, 1976). Se caracterizó bioquímicamente en 1978 (Heaton *et al.*, 1978) y fue aislada en 1980 (Lin & Klingenberg, 1980). La UCP1 se clonó en la rata (Bouillaud *et al.*, 1985) identificándose su cadena de aminoácidos (Bouillaud *et al.*, 1986), variando entre 32 y 33 kDa de peso molecular según la especie (Freeman *et al.*, 1985). La secuencia también se determinó a partir de la proteína existente en el hámster, poniéndose de manifiesto que poseía una estructura semejante al translocador de ADP/ATP (Aquila *et al.*, 1982). A su vez, se codifica por un gen que contiene 6 exones (Bouillaud *et al.*, 1988, Cassard *et al.*, 1990, Kozak *et al.*, 1988) localizado en el cromosoma 8 en ratones (Jacobsson *et al.*, 1985) y en el 4 en humanos (Cassard *et al.*, 1990).

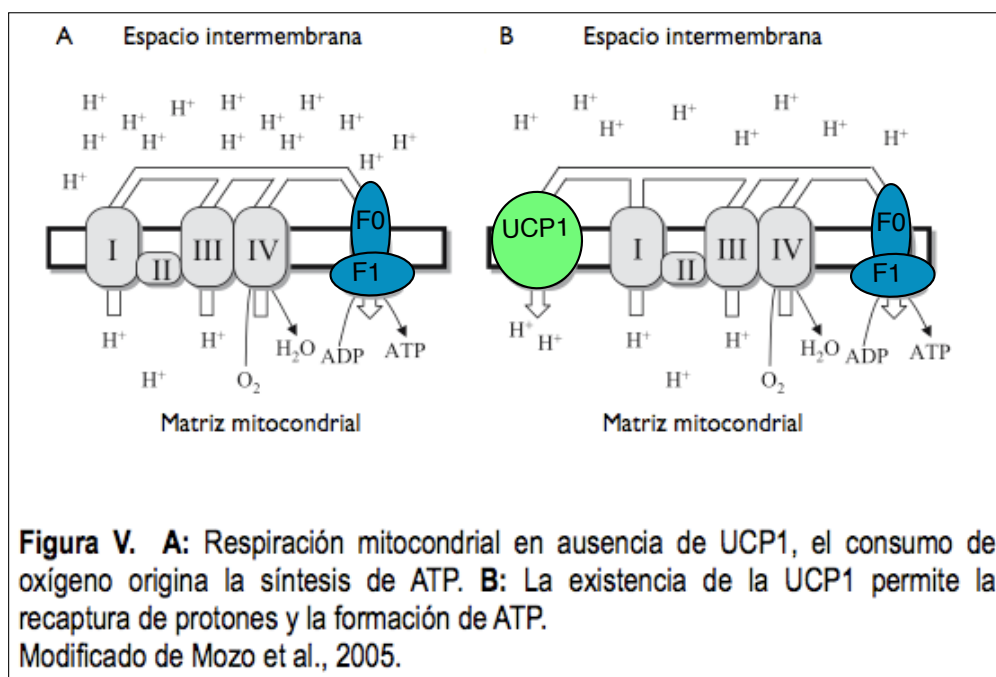
El 10% del contenido proteico de la membrana mitocondrial en los adipocitos pardos, se debe a la UCP1 (Ricquier & Kader, 1976), cuyas funciones se pueden dividir en dos tipos. Por un lado, es responsable del fenómeno de termogénesis sin escalofríos inducida por frío (Golozoubova *et al.*, 2001, Nedergaard *et al.*, 2001). En este caso, se da la producción de calor como respuesta al frío (ver figura IV), lo que permite el mantenimiento de la temperatura corporal. En condiciones normales, la oxidación de sustratos produce un gradiente de protones que origina la síntesis de ATP al atravesar la ATP-sintasa de la membrana mitocondrial interna (ver figura V). La presencia de la proteína UCP1, ubicada también en la membrana mitocondrial interna de los adipocitos pardos, induce la disipación del gradiente de protones sin la consiguiente producción

Introducción

de ATP pero con una intensa génesis calórica. Los ácidos grasos se utilizan como combustible de la producción de calor (revisado por Cinti, 2006). Debido a la abundancia de ácidos grasos y del número de mitocondrias la producción de calor por parte de estos adipocitos puede ser muy elevada (Klaus *et al.*, 1991). La señal para la activación de este proceso es una temperatura ambiental por debajo de la temperatura crítica inferior del rango de termoneutralidad. En tal caso, la noradrenalina activa los receptores β_3 que inducirán la señalización celular para la producción de calor (ver figura IV). Por otro lado, la UCP1 tiene un papel en la adaptación metabólica a diferentes dietas en un proceso conocido como termogénesis inducida por la dieta del que todavía queda mucho por estudiar (Cannon & Nedergaard, 2004, Kageyama *et al.*, 2003, Kontani *et al.*, 2005).



Introducción



La BAT, en las especies de mamíferos de mediano o gran tamaño, aparece en los recién nacidos para ir desapareciendo progresivamente con la edad (revisado por Cinti, 2006) aunque en los adultos, pueden encontrarse adipocitos pardos aislados entre los adipocitos blancos (figura III). Este fenómeno es muy interesante, a la vez que ha suscitado dos interpretaciones diferentes. Aunque no es un mecanismo universalmente aceptado, podría existir una trans-diferenciación de los adipocitos blancos a pardos en respuesta a condiciones de temperatura desfavorable y a fármacos agonistas de los receptores adrenérgicos β_3 (Cinti, 2006). El fenómeno descrito, podría usarse como tratamiento antiobesidad debido a las características termogénicas de la BAT. De hecho, se han encontrado masas de BAT en adultos, activas desde el punto de vista metabólico, lo suficientemente grandes y que podrían usarse como diana para el tratamiento de la obesidad (Nedeergaard *et al.*, 2007).

Introducción

II. Los adipocitos y el balance energético.

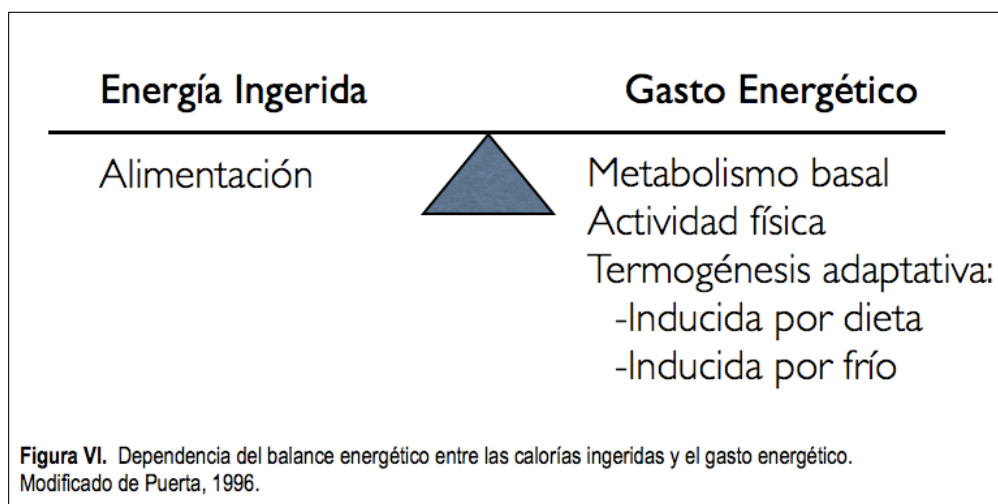
Según la primera ley de la termodinámica, la energía que capta un organismo ha de ser igual a la energía que libera. Desde un punto de vista práctico, este balance energético también puede expresarse según la relación (Mokdad *et al.*, 2003):

$$\text{Energía Ingerida} = \text{Gasto Energético} + \text{Energía Almacenada}$$

Los componentes de esta ecuación son: (1) la energía ingerida en forma de alimento, (2) el gasto energético, es decir, la energía liberada en forma de calor como resultado del metabolismo y la energía consumida en forma de trabajo y por último, (3) el exceso de energía química que además, puede almacenarse. En condiciones en las que la energía ingerida en forma de alimento es suficiente para equilibrar la cantidad de energía liberada en forma de calor y de trabajo, el almacén energético permanece constante (Pocock & Richards, 2004). Este proceso no sucede así minuto a minuto, ya que puede existir un desequilibrio de tal manera que el excedente energético se pierde a través del catabolismo de los lípidos en situaciones de ayuno, o bien se almacena en forma de TG en la WAT (ver figura VI, -Pocock & Richards, 2004, Rosen & Spiegelman, 2006-). Es por esto que los seres vivos tienen mecanismos de regulación del balance energético, y así evitan las situaciones de exceso de almacenaje energético que se traducen en un aumento excesivo del peso corporal (Schwartz *et al.*, 2003). Una forma de control del balance energético, se ejerce mediante la reducción del alimento ingerido, por cierto, un mecanismo de acción voluntaria. El proceso anterior se relaciona con otros mecanismos de reducción del gasto energético. Estos procesos no son en absoluto voluntarios y dependen de una larga y variada lista de factores. En definitiva, todos los mecanismos de control del balance energético son considerablemente más complejos que una interpretación simplista de la ecuación dada anteriormente (Rosen & Spie-

Introducción

gelman, 2006). En resumen, el balance energético se ve afectado por factores externos de naturaleza psicológica y cultural, a la vez que por mecanismos internos de naturaleza nerviosa (como la regulación por parte de ciertos péptidos hipotalámicos del apetito -Lopez et al., 2007-) y hormonal en los que nos centraremos brevemente (Abizaid et al., 2006).



Las primeras señales de control del balance energético proceden del tracto digestivo y de sus órganos asociados ya que éstos pueden controlar a corto plazo la cantidad de alimento ingerido (Lopez et al., 2007). Así, mediante el sistema nervioso entérico y las hormonas producidas en el tracto digestivo se controla el comienzo y la finalización de cada comida (Badman & Flier, 2005, Halford & Blundell, 2000, Perez-Tilve et al., 2006). El sistema nervioso entérico, proyecta fibras al sistema nervioso central que junto con el sistema nervioso parasimpático y simpático puede controlar los procesos de motilidad digestiva y el tamaño de la ingestión de alimento. Estas señales nerviosas, a su vez, originan la producción de hormonas que actúan en el sistema nervioso central

Introducción

y que pueden controlar la energía ingerida. Una de las primeras hormonas descritas con estas actuaciones es la colecistoquinina (CCK) que se secreta por las células del duodeno en respuesta a la ingestión del alimento y que reduce el tamaño de la comida así como la duración de la alimentación y por tanto regula a corto plazo la ingestión de alimento (Konturek *et al.*, 2004, Lopez *et al.*, 2007, Muurahainen *et al.*, 1988). A su vez, otras hormonas producidas en el tracto digestivo son, la oxintomodulina (OXM) y el péptido similar a glucagón (GLP-1), ambos inhiben el comportamiento alimentario (Dakin *et al.*, 2004, Turton *et al.*, 1996). Estas dos no son las únicas; también se conocen con acciones anorexigénicas como el péptido YY y la bombesina (Lopez *et al.*, 2007, Martins *et al.*, 2007, Silveira Rodriguez *et al.*, 2006, Theisen *et al.*, 2007). Por último, otra hormona con acciones orexigénicas y por tanto que contribuye al equilibrio energético es la ghrelina (De Vriese & Delporte, 2007, Lopez *et al.*, 2007). Algunas otras hormonas implicadas en la regulación del balance energético son las hormonas del tiroides, los glucocorticoides, esteroides sexuales o la insulina (Coppola & Diano, 2007). Por último, desde el descubrimiento de la leptina (ver resumen conceptual 1), se sabe que la WAT es un tejido implicado también en la regulación del apetito y por lo tanto en el balance energético (Anghel *et al.*, 2007, Lopez *et al.*, 2007). De hecho, la WAT no sólo puede informar al sistema nervioso central, sino que puede en el organismo ejercer acciones sobre el balance energético mediante la regulación de la ingestión de alimento, así como del gasto energético y de las rutas metabólicas, a través de mecanismos nerviosos y mecanismos hormonales (leptina, IL-1 etc: -Coppola & Diano, 2007, Garcia *et al.*, 2006-). Así pues, se producen en el “secretoma” de la WAT una serie de factores proteicos y de señales que no sólo se relacionan con el metabolismo de las grasas sino que se implican con la regulación de otros procesos de naturaleza diversa (Trayhurn, 2007).

Resumen Conceptual 1. La Leptina

El descubrimiento de la leptina en 1994 por Friedman y colaboradores (Zhang *et al.*, 1994) marcó un hito en los mecanismos de control energético y en el concepto moderno del tejido adiposo. Es una adipocina de 16kDa (Zhang *et al.*, 1994) sintetizada y liberada en los adipocitos blancos en respuesta a cambios en la cantidad de la grasa (Ronti *et al.*, 2006), aunque también se produce en la grasa parda, estómago, placenta, glándula mamaria, folículos ováricos y ciertos órganos fetales como corazón, hueso o cartilago y cerebro (Masuzaki *et al.*, 1997, Trayhurn & Beattie, 2001, Trayhurn *et al.*, 1999). Se codifica por un gen llamado *ob* y recibe el nombre de leptina que en griego significa delgado (Ronti *et al.*, 2006). Fue la primera adipocina descrita capaz de modular la adiposidad (Friedman, 1999, 2002, Hallas *et al.*, 1995, Pelleymounter *et al.*, 1995). Su principal función es la de disminuir el consumo de alimento y promover el gasto energético (Rosen & Spiegelman, 2006) (ver figura VI). Así pues, los animales y los humanos con una mutación en el gen de la leptina o en su receptor, son obesos. Aunque el receptor de leptina se encuentra en diferentes localizaciones, los niveles de su síntesis son muy bajos, en cualquier localización, en comparación con los existentes en el hipotálamo mediobasal, en concreto en el núcleo ventromedial, el dorsomedial y el núcleo arqueado (Bjorbaek & Kahn, 2004, Fei *et al.*, 1997, Schwartz *et al.*, 1996). La leptina, unida a su receptor, inicia una señal de represión de rutas orexigénicas en el núcleo arqueado (neuropéptido Y, péptido liberador agouti) e inducción de rutas anorexigénicas (tales como pro-opiomelanocortinas y transcrito regulador de anfetamina y cocaína, - Arora & Anubhuti, 2006) .

Introducción

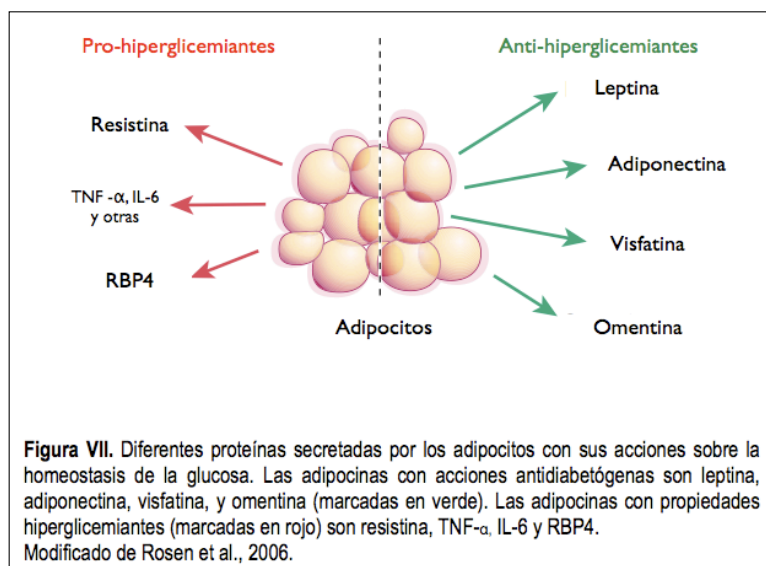
III. Obesidad y disfunciones metabólicas: la WAT como órgano endocrino.

Según lo visto en el apartado anterior, la WAT no sólo es un reservorio energético sino que además está implicada en la regulación del balance energético. Como ya se citó, un desequilibrio en el balance energético implica un aumento de la acumulación de TG en el tejido adiposo. Así, la obesidad es el resultado del exceso de energía almacenada en la WAT (Coll *et al.*, 2007, Lopez *et al.*, 2007). El resultado de este incremento de la grasa en el organismo, es una elevada correlación positiva con el síndrome metabólico o conjunto de anormalidades metabólicas tales como riesgo cardiovascular, intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus de tipo 2, dislipemia, hipertensión y aumento de los depósitos de grasa visceral en la denominada obesidad “central” (Petruzzelli *et al.*, 2007, Rodriguez *et al.*, 2007). Para explicar la relación entre obesidad y enfermedad surgen diferentes teorías.

La primera hipótesis, visceral/portal, postula que como consecuencia del incremento de los depósitos viscerales se origina un aumento de los AG libres en la sangre, lo que inhibe la acción de la insulina en los órganos sensibles a la misma (Heilbronn *et al.*, 2004, Randle *et al.*, 1963, Ronti *et al.*, 2006). A largo plazo, estos AG libres tienen efectos lipotóxicos en el páncreas, lo que podría relacionar obesidad y diabetes tipo 2 (Wilding, 2007). Esta hipótesis por si sola sólo puede explicar los fenómenos de resistencia a la insulina. Basándose en diferentes descubrimientos, dos nuevas hipótesis han surgido para explicar la relación obesidad-enfermedad. Una de ellas, la teoría del síndrome de acúmulo de grasa ectópica, se basa en diferentes descubrimientos. En primer lugar, en los casos de lipodistrofia, es decir, de fallo en el acúmulo de grasa en el tejido adiposo en pro de acúmulos en el hígado, músculo esquelético y páncreas, se origina severa resistencia a la insulina y diabetes. A su vez, los individuos obesos pre-

Introducción

sentan similares acúmulos de grasa lo que nuevamente se correlaciona con la resistencia a la insulina (Chaldakov *et al.*, 2003, Garg, 2006). Simultáneamente a esta segunda hipótesis surge el concepto de tejido adiposo como órgano endocrino (concepto denominado como el paradigma endocrino). Como ya se comentó en el apartado anterior, desde el descubrimiento de la leptina el concepto de la WAT, ha cambiado enormemente. Así, cada adipocito produce una serie de péptidos bioactivos denominados adipocinas que tienen no sólo efecto en el mismo adipocito sino que pueden liberarse a la sangre y tener efectos múltiples en otras localizaciones del organismo y de los cuales se han descrito unos 50 (Ronti *et al.*, 2006, Trayhurn, 2007). Estas moléculas, son la clave para explicar la relación obesidad- enfermedad (ver figura VII y tabla 1) y por tanto convertirse en dianas terapéuticas. De todas las adipocinas descritas, vamos a centrar nuestro estudio en cuatro que son: **adiponectina, resistina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6)**.



Introducción

Tabla I. Algunas de las adipocinas y sus principales efectos.

Adipocinas	Efecto
Adiponectina	Inflamación, aterosclerosis y resistencia a la insulina.
Leptina	Ingestión de alimento, reproducción, angiogénesis e inmunidad.
IL-6	Inflamación, aterosclerosis y resistencia a la insulina.
PAI 1	Homeostasis vascular
Adipsina	Respuesta inmune al estrés
TNF	Inflamación, aterosclerosis y resistencia a la insulina.
Resistina	Inflamación y resistencia a la insulina.
Angiotensinógeno	Homeostasis vascular
Visfatina	Resistencia a la insulina
Apelina	Resistencia a la insulina

1. La Adiponectina.

La adiponectina, es inicialmente identificada por cuatro grupos de investigación que usaban tanto modelos murinos como humanos, de ahí que haya recibido diferentes nombres: AdipoQ (Hu *et al.*, 1996), apM1 (Maeda *et al.*, 1996), GBP28 (Nakano *et al.*, 1996), ACRP30 (Scherer *et al.*, 1995). El gen de la adiponectina, localizado en el cromosoma 16 de los roedores (Das *et al.*, 2001) y en el 3q27 en humanos (Takahashi *et al.*, 2000), da lugar a una proteína de 244 aminoácidos (Szmitko *et al.*, 2007) y 30 kDa de peso molecular (Waki *et al.*, 2003) que puede presentarse en forma de trímero,

Introducción

hexámero o multímero de 12-18 subunidades (Pajvani *et al.*, 2003) (ver figura VIII). Se expresa casi exclusivamente en el tejido adiposo (Rosen & Spiegelman, 2006), aunque se ha encontrado expresión en cardiomiocitos (Pineiro *et al.*, 2005) y recientemente en las células madre hematopoyéticas (DiMascio *et al.*, 2007) y en el oviducto de la rata (Archanco *et al.*, 2007). La adiponectina, no sólo se localiza en los tejidos descritos anteriormente, sino que aparece en el suero tanto de humanos como de roedores (Szmitko *et al.*, 2007). Es más, en la sangre representa el 0.01% del contenido proteico total (Arita *et al.*, 1999, Salani *et al.*, 2006), se puede decir que circula en altas concentraciones en comparación, por ejemplo, con las de la leptina o del TNF- α (Arita *et al.*, 2002, Szmitko *et al.*, 2007).

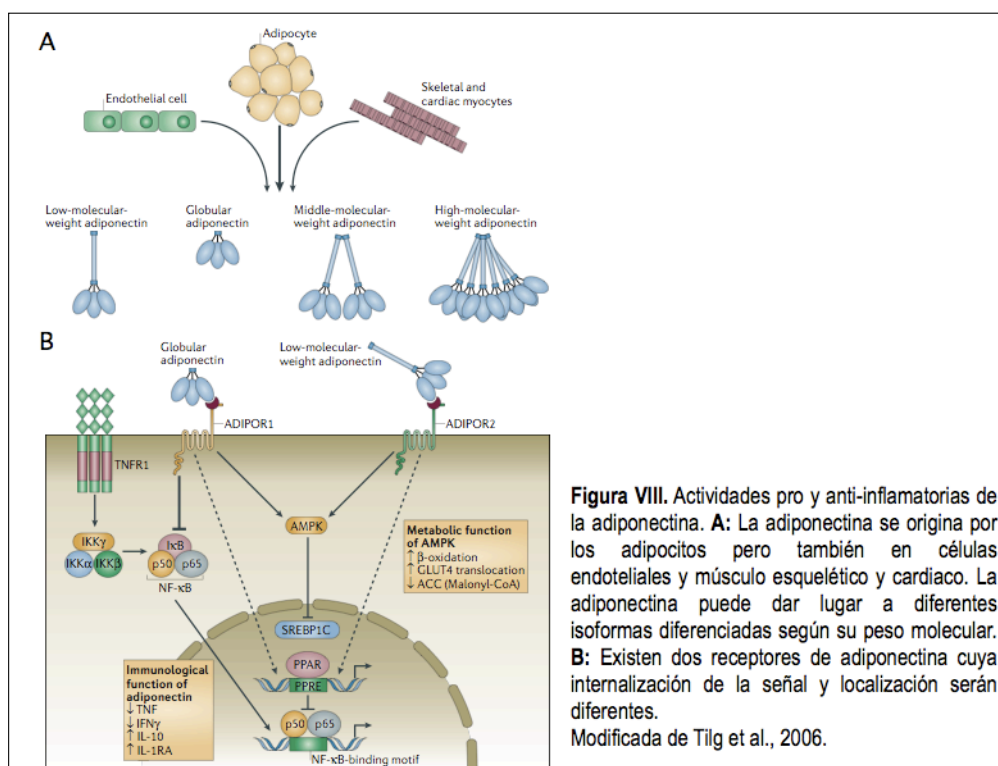


Figura VIII. Actividades pro y antiinflamatorias de la adiponectina. **A:** La adiponectina se origina por los adipocitos pero también en células endoteliales y músculo esquelético y cardíaco. La adiponectina puede dar lugar a diferentes isoformas diferenciadas según su peso molecular. **B:** Existen dos receptores de adiponectina cuya internalización de la señal y localización serán diferentes. Modificada de Tilg *et al.*, 2006.

Introducción

Puesto que la adiponectina, es una adipocina secretada por la WAT, inicialmente se midieron sus niveles en el plasma de modelos animales de obesidad y en humanos, obteniendo resultados muy significativos. Así, los animales obesos ob/ob presentan entre un 70-90% de reducción en la expresión de la proteína, en relación con los controles y una consiguiente disminución en sus niveles plasmáticos (Hu *et al.*, 1996, Maeda *et al.*, 2001). Los hallazgos encontrados en los humanos son similares, a saber, los niveles de adiponectina son más bajos en la sangre de los obesos en relación con sus controles (Arita *et al.*, 1999). Por tanto, existe una correlación negativa de los niveles de adiponectina con el índice de masa corporal (BMI, -Arita *et al.*, 1999; Szmitko *et al.*, 2007-). A su vez, esta correlación se encuentra más marcada en los depósitos viscerales que en los subcutáneos (Cnop *et al.*, 2003, Szmitko *et al.*, 2007), existiendo una relación con el síndrome metabólico (obesidad principalmente visceral, hiperlipidemia y resistencia a la insulina, -Okamoto *et al.*, 2006-). Bajo esta perspectiva, la adiponectina también se relaciona con la diabetes tipo II (Hotta *et al.*, 2000, Kowalska *et al.*, 2006). En efecto, los niveles de adiponectina en la sangre de los diabéticos son significativamente menores que en la de sus controles (Hotta *et al.*, 2000, Ohya *et al.*, 2005). En los modelos animales de resistencia a la insulina, la inyección de adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina y reduce la hiperglicemia (Berg *et al.*, 2001, Maeda *et al.*, 2001, Yamauchi *et al.*, 2003). Por otro lado, en ratones obesos la inyección de adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina (Yamauchi *et al.*, 2001), hecho que se ve reforzado por el papel protector que ejerce dicha proteína frente a la resistencia a la insulina en modelos animales carentes de la adiponectina (Kubota *et al.*, 2002, Maeda *et al.*, 2002). Estos hallazgos no se dan tan sólo en roedores, sino que en otras especies, como el macaco rhesus, la concentración en el plasma de la adiponectina disminuye en paralelo al desarrollo de la diabetes tipo II (Hotta *et al.*, 2001, Tigno *et al.*, 2003). Por

Introducción

último, los niveles elevados de adiponectina, se ha sugerido que presentan un papel protector frente al desarrollo de la resistencia a la insulina (Daimon *et al.*, 2003, Goraliski & Sinal, 2007, Spranger *et al.*, 2003). Un ejemplo de ello se encuentra en un caso de estudio con los indios Pima, propensos a la obesidad, diabetes tipo II y resistencia a la insulina, en los que aquellos individuos con altos niveles de adiponectina en la sangre desarrollaban menos diabetes tipo II frente a los que tenían una concentración menor (Krakoff *et al.*, 2003, Lindsay *et al.*, 2002, Lindsay *et al.*, 2003). Este mismo papel protector de la adiponectina frente a la resistencia a la insulina, se ha observado en caucásicos (Spranger *et al.*, 2003) y en japoneses (Daimon *et al.*, 2003, Matsuhisa *et al.*, 2007, Tamura *et al.*, 2007). Un último hecho que apoya la relación adiponectina resistencia a la insulina y diabetes tipo II, es la acción que los fármacos antidiabéticos (como las tiazolidinedionas o TZD) tienen sobre la proteína, ya que aumentan su síntesis y su secreción a la sangre (Kubota *et al.*, 2006, Nawrocki *et al.*, 2006).

La adiponectina, a su vez, interviene en los mecanismos inflamatorios (Capeau, 2007), ejerciendo acciones sobre las células del sistema inmunológico, (ver figura IX, -Tilg and Moschen, 2006, Wolf *et al.*, 2004, Yokota *et al.*, 2000-) y como consecuencia de la alteración de los niveles de adiponectina y de las moléculas inflamatorias así como de células y otros componentes del sistema inmunológico, se han descrito una serie de enfermedades como daños cardiacos (Shibata *et al.*, 2004, Shibata *et al.*, 2005), cáncer (Brakenhielm *et al.*, 2004, Bub *et al.*, 2006, Mantzoros *et al.*, 2007), enfermedad inflamatoria intestinal (Karmiris *et al.*, 2006, Yamamoto *et al.*, 2005) y artritis reumatoide (Schaffler *et al.*, 2003, Senolt *et al.*, 2006) entre otras. Otros mecanismos en los que interviene es en los procesos de aterogénesis (Calabro & Yeh, 2007) y de hematopoyesis (DiMascio *et al.*, 2007).

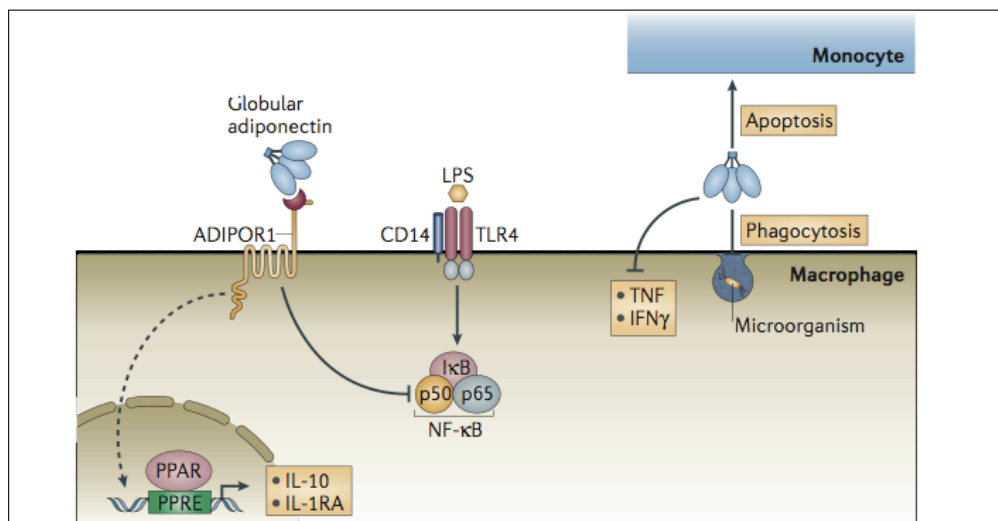


Figura IX. Efectos de la adiponectina sobre el sistema monocito-macrófago. La adiponectina interactúa con los receptores adipoR1 y R2 suprimiendo el factor de transcripción nuclear NF- κ B dependiente de la síntesis del factor de necrosis tumoral TNF y de interferón gamma IF- γ y por tanto favoreciendo la producción de IL-10 y del receptor antagonista de IL-1 moléculas anti-inflamatorias. La adiponectina, a su vez, induce la apoptosis de monocitos e inhibe la fagocitosis por parte de los macrófagos lo que previene los mecanismos de aterogénesis. Modificada de Tilg et al., 2006.

2. La Resistina.

La resistina es un péptido de 12,5 kDa, rico en cisteína y que pertenece a una familia de proteínas denominadas “resistin-like” (RELMS) (Steppan *et al.*, 2001b). Originalmente, fue descrita por tres grupos independientes de investigadores que trabajaban en áreas bien diferenciadas (Holcomb *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2001, Steppan *et al.*, 2001a). Los estudios iniciales, mostraron una regulación a la alta de los niveles de resistina en modelos animales de roedores con obesidad y resistencia a la insulina. Por otro lado, al tratar los animales con sensibilizadores de la acción de la insulina, como la

Introducción

rosiglitazona (RSG), se observaba una regulación a la baja (Holcomb *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2001, Steppan *et al.*, 2001a). A su vez, cuando se inmunoneutralizaba la concentración de resistina en la sangre, se veía una mejora de la hiperglucemia y de la sensibilidad a la insulina (Steppan *et al.*, 2001a). Estas primeras observaciones causaron una gran expectación, ya que la resistina parecía ser la potencial causa de la etiología de una de las enfermedades de mayor prevalencia en el mundo, esto es, la diabetes tipo II. Actualmente, sus acciones, así como sus mecanismos de actuación e incluso sus relaciones con la obesidad y la diabetes tipo II están siendo profundamente debatidas, debido a que desde su descubrimiento se han encontrado hallazgos muy contradictorios.

El gen que codifica para la síntesis de resistina se ha denominado Retn que da lugar a la síntesis de un polipéptido de 114 aminoácidos (Steppan *et al.*, 2001a), y que configurará un homodímero unido mediante puentes di-sulfuro (Banerjee & Lazar, 2001). Gracias a los estudios de difracción de rayos X, se puede decir que su conformación espacial se corresponde con un hexámero (Patel *et al.*, 2004).

En roedores, la expresión de resistina se encuentra predominantemente localizada en el tejido adiposo blanco (Steppan *et al.*, 2001a) aunque también puede expresarse en la BAT (Oliver *et al.*, 2003), el músculo (Palanivel *et al.*, 2006), el tracto digestivo, el hígado, los riñones, el corazón (Nogueiras *et al.*, 2003), los pulmones (Holcomb *et al.*, 2000, Nohira *et al.*, 2004) e incluso en el hipotálamo (Wilkinson *et al.*, 2005). A su vez, se han encontrado diferencias sexuales en los niveles plasmáticos de resistina así como su expresión en el tejido adiposo (Gui *et al.*, 2004).

En humanos, la resistina principalmente se expresa en los macrófagos (Makkonen *et al.*, 2007) aunque algunos estudios determinan expresión de resistina por parte de

Introducción

los adipocitos (Baker *et al.*, 2006, McTernan *et al.*, 2002). Otros, sin embargo, no la han encontrado (Fain *et al.*, 2003), aunque si se han encontrado altos niveles de expresión en la medula ósea (Patel *et al.*, 2003) así como en células del sistema inmunológico (Curat *et al.*, 2006, Jung *et al.*, 2006). También otros tejidos como la placenta (Lappas *et al.*, 2005), los pulmones (Patel *et al.*, 2003) y las células pancreáticas (Minn *et al.*, 2003) pueden expresar resistina.

Los estudios iniciales mostraban que la resistina podía ser la proteína causante de la resistencia a la insulina y, por tanto, del desarrollo de la diabetes tipo II. En la sangre de ratones obesos ob/ob, db/db e incluso en modelos donde se inducía obesidad mediante la dieta (DIO), fueron encontrados altos niveles de dicha molécula (Steppan *et al.*, 2001a). Por otro lado, la pérdida de peso en sujetos obesos conlleva una disminución en los niveles de la proteína, luego los datos apuntan a una posible relación resistina-obesidad (Jung *et al.*, 2007). En otros modelos donde se estudia no sólo la relación resistina-obesidad mediante pérdida de peso, sino también la resistencia a la insulina en estados fisiológicos como la vejez, se observa un aumento de la proteína cuanto mayor es la resistencia a la insulina y la cantidad de grasa visceral, mientras que nuevamente se reducen sus niveles cuando se realiza una restricción en la comida (Brown *et al.*, 2007). Parece evidente que la resistina se relaciona con la diabetes tipo II y con la obesidad. Algunos otros datos que confirman esta idea son que la sobre-expresión de resistina en adipocitos 3T3-L1, afecta al metabolismo lipídico y contribuye no sólo a la obesidad sino también a la resistencia a la insulina (Gu *et al.*, 2007). Otros trabajos ponen de manifiesto hechos contrarios a lo mostrado anteriormente, así en una variedad de modelos animales donde se medía la expresión y niveles circulantes de la proteína, la resistina se encontró disminuida (Juan *et al.*, 2001, Rajala *et al.*, 2004). Todos estos hechos, independientemente de si tiene un papel sensibi-

Introducción

lizador o productor de resistencia a la insulina, determinan una relación de la proteína con la obesidad y la diabetes tipo II aunque probablemente el mayor peso en el desarrollo de la diabetes tipo II no residiría en esta molécula sino en otras (Kusminski *et al.*, 2005, Ronti *et al.*, 2006). En efecto, se han asociado las acciones de la resistina con otras moléculas como IL-6 o TNF- α (Wang *et al.*, 2007). Estas moléculas, pueden incrementar la expresión de resistina en humanos (Kusminski *et al.*, 2007), aunque por otro lado, la resistina ejerce acciones sobre IL-6 o TNF- α como se observa en las actuaciones de la proteína sobre el hipotálamo, lo que favorece la expresión de IL-6 o TNF- α , y por tanto puede contribuir a la hiperglicemia en el diabetes tipo II (Muse *et al.*, 2007).

3. El factor de necrosis tumoral alfa: TNF- α .

El TNF- α es una citoquina con múltiples actividades inmunológicas. Inicialmente se describió como causante de la necrosis asociada a la sepsis en animales; también se asoció a los estados de caquexia inducida por infecciones y cáncer (Coppack, 2001). Se expresa como una proteína de 26kD en la superficie celular para sufrir una reducción a 17kD en un estado soluble o forma activa de la proteína.

El TNF- α se sintetiza en múltiples tipos celulares aunque los macrófagos son los mayores productores. En 1993 se descubrió su síntesis en el tejido adiposo, siendo producida por adipocitos maduros así como en las células del estroma vascular (Hotamisligil *et al.*, 1993). En seguida se relacionó su síntesis en el tejido adiposo con los estados de obesidad y de resistencia a la insulina (Katsuki *et al.*, 1998). En efecto, la neutralización de TNF- α mejora la resistencia a la insulina en ratas obesas (Hotamisligil *et al.*, 1993, Ronti *et al.*, 2006). Cuando se agrega TNF- α en cultivos celulares se reduce

Introducción

la acción de la insulina, mientras que al inhibir la adipocina mediante agentes bioquímicos se restauraba la sensibilidad a la insulina, (Rosen & Spiegelman, 2006). Los mismos resultados se encuentran en ratones (Rosen & Spiegelman, 2006). Otros autores, al neutralizar la proteína mediante anticuerpos, no encontraban una mejoría de la glicemia o la sensibilidad a la insulina (Ofei *et al.*, 1996). Estos datos contradictorios, ponen de manifiesto una relación entre el TNF- α con la obesidad y la sensibilidad a la insulina de manera directa e indirecta. Así, Peraldi y sus colaboradores (Peraldi *et al.*, 1996) encontraron que el TNF- α interfiere con los mecanismos de señalización intercelular de insulina lo que impide las acciones de la misma. De hecho, aunque no existe una correlación entre la cantidad de tejido adiposo y los niveles en sangre de TNF- α , si que se ha encontrado entre su expresión y la cantidad de tejido adiposo, dato que puede apuntar a acciones de carácter paracrino y autocrino por parte del TNF- α en el tejido adiposo (Jellema *et al.*, 2004). A su vez, el TNF- α disminuye los niveles de otras adipocinas como la adiponectina e incrementa la síntesis de la IL-6 lo que hace que contribuya indirectamente a la resistencia a la insulina (Ruan *et al.*, 2002). Por último, el TNF- α incrementa la lipólisis lo que origina un aumento en el plasma de la concentración de ácidos grasos lo que conlleva que se favorezca la lipotoxicidad e indirectamente la resistencia a la insulina (Yu & Ginsberg, 2005).

4. La Interleucina 6: IL-6.

La IL-6 es una citoquina circulante con múltiples efectos en la inflamación, defensa inmunológica y respuesta frente al daño tisular. Es sintetizada por múltiples tipos celulares que incluyen las células inmunológicas, fibroblastos, células endoteliales, células del músculo esquelético y tejido adiposo y circula en el plasma como una proteína

Introducción

glicosilada (Mohamed-Ali *et al.*, 1998, Ronti *et al.*, 2006). De hecho, la IL-6 es una adipocina cuya concentración en plasma se correlaciona con los niveles de grasa total (Bastard *et al.*, 2000). Además, entre el 10-30% de su contenido en el plasma procede del tejido adiposo blanco (Mohamed-Ali *et al.*, 1997). Esta aportación plasmática, sin embargo, no procede del adipocito maduro sino de preadipocitos, células endoteliales y monocitos (Fain *et al.*, 2004).

Los receptores de IL-6 se encuentran presentes en la mayoría de los tipos celulares. Éstos, pertenecen a una familia de receptores de citoquinas de clase I que usan el sistema de internalización de señales Jak/Stats. Se sabe que estas rutas de señalización interfieren con las de la insulina y por tanto la IL-6 se ha propuesto como un agente capaz de desarrollar la resistencia a la insulina (Ihle *et al.*, 1995, Mooney *et al.*, 2001). De hecho, la IL-6 incrementa la glicemia y produce resistencia a la insulina (Tsigos *et al.*, 1997). En la WAT, esta adipocina disminuye la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) incrementando la lipólisis, de esta manera aumentan los niveles de ácidos grasos en el plasma favoreciendo su lipotoxicidad y así dando lugar a resistencia a la insulina (Greenberg *et al.*, 1992). Otras acciones descritas para la IL-6 son su participación en la disminución de la síntesis y liberación de adiponectina, lo que contribuye indirectamente con la resistencia a la insulina (Fasshauer *et al.*, 2003).

De todos los múltiples efectos de la IL-6 también tiene acciones sobre el metabolismo. Los ratones deficientes en IL-6 desarrollan obesidad que revierte con dosis fisiológicas de la proteína (Wallenius *et al.*, 2002). Su inyección intracerebroventricular, pero no periférica, incrementa el gasto energético a través de la activación del sistema nervioso simpático, reduciendo el peso corporal y la masa de los depósitos de grasa blanca (Jansson *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2002, Wernstedt *et al.*, 2006). La presencia del recep-

Introducción

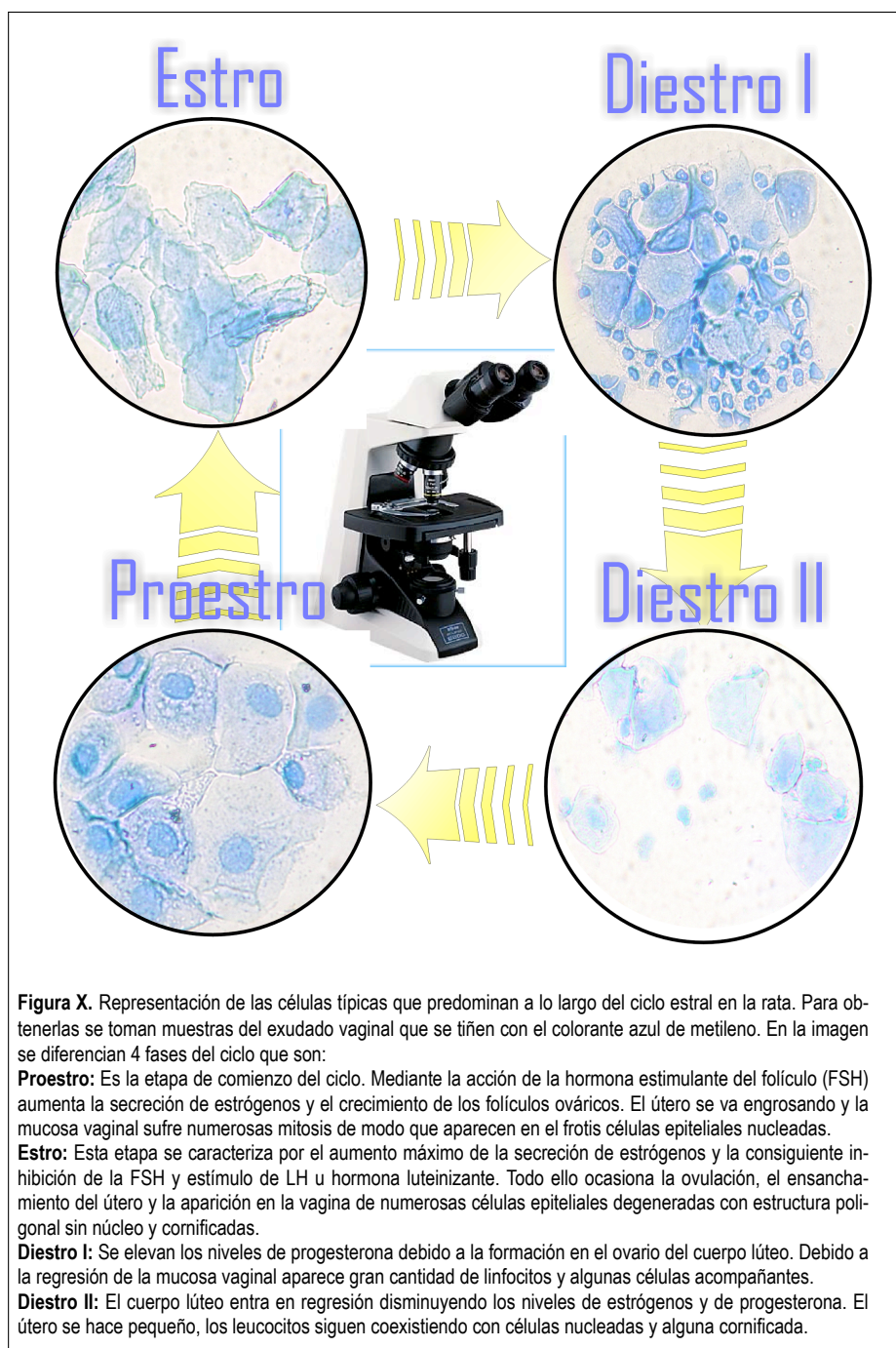
tor de IL-6 en el hipotálamo, confirma acciones en el control del gasto energético a nivel del sistema nervioso central (Li *et al.*, 2002). Se desconoce si la IL-6 se produce a nivel central o los niveles periféricos sirven de señal en el hipotálamo, aunque la inyección sistémica de IL-6 produce activación en ciertos marcadores hipotalámicos (Li *et al.*, 2002, Schobitz *et al.*, 1993). Sin embargo, en humanos obesos no existe una correlación entre sus niveles en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo (Jansson *et al.*, 2003, Stenlof *et al.*, 2003).

IV. La gestación en la rata.

La rata y en general los roedores, han sido y siguen usándose como herramientas en el estudio científico. Conocer su fisiología así como su biología es crucial, para otros estudios, por eso vamos a ver algunos elementos en relación con la gestación en la rata.

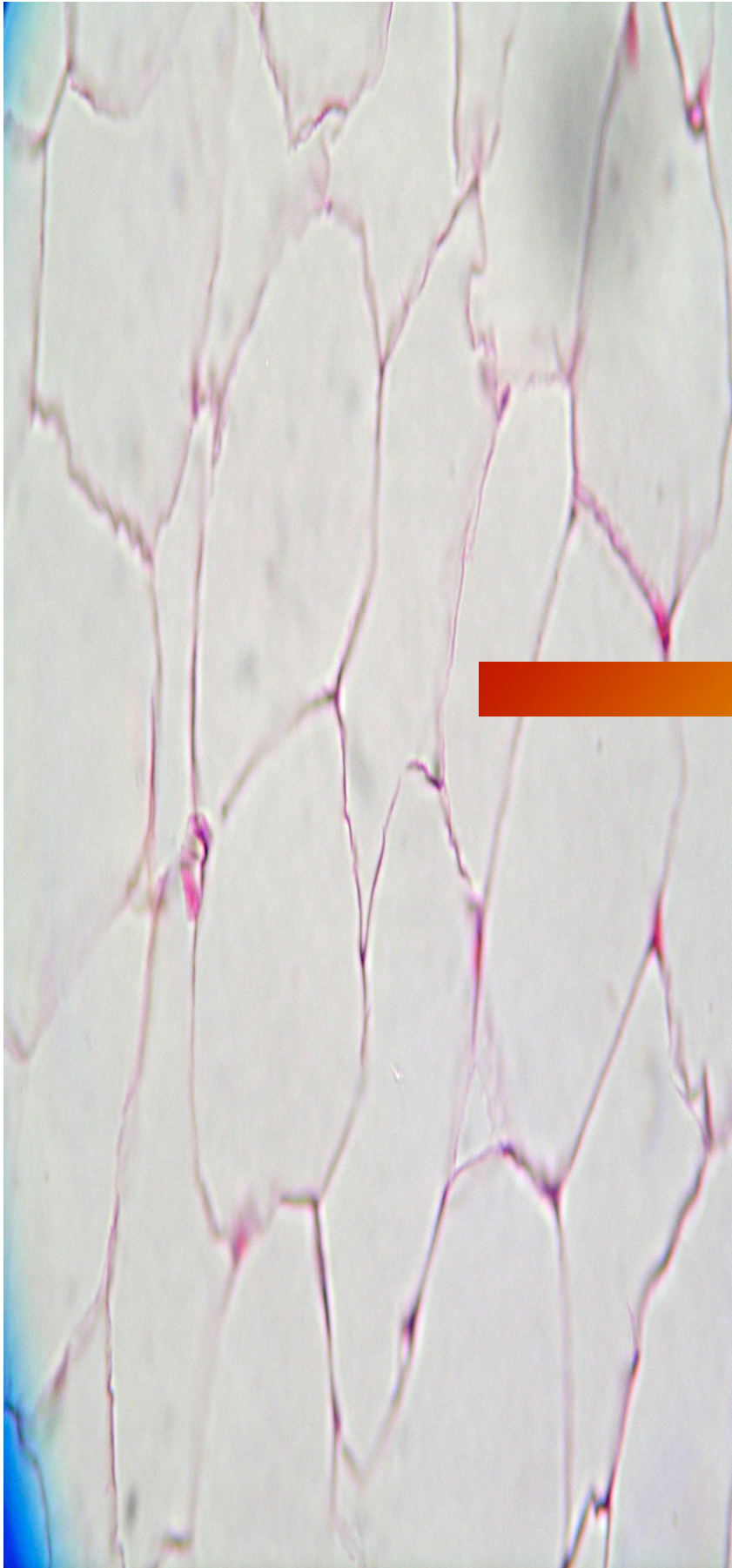
La rata hembra presenta un ciclo estral que atraviesa 4 estadios con movimientos hormonales bien diferenciados y que se han denominado proestro, estro, diestro I y diestro II (ver figura X). El estradiol que se produce durante el estro del animal, se regula por el ovario y mantiene junto con la progesterona la receptividad sexual en la etapa periovulatoria (Pfaff & Sakuma, 1979). La estimulación vaginocervical producida durante la cópula inicia una serie de cambios neuroendocrinos que van a condicionar el éxito de la reproducción. Así, esta estimulación dispara la liberación de dos picos de prolactina (uno nocturno y otro diurno), originando unos niveles que pueden persistir hasta 10-12 días, lo que impide la regresión del cuerpo lúteo en el ovario (Freeman, 1979, Smith *et al.*, 1975, Smith *et al.*, 1976). Todo ello conlleva la secreción sostenida de progesterona que servirá para iniciar y mantener la gestación (Erskine *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 1975). Tras la cópula, puede ocurrir que no se produzca la fecundación, en este estado que se ha denominado pseudogestación, se producen los dos picos prolactina y el inicio del comportamiento maternal (Erskine *et al.*, 2004). De manera interesante, la pseudogestación, puede inducirse por estimulación vaginocervical (Erskine *et al.*, 2004).

Introducción



Introducción

La rata durante la gestación puede servir como modelo del estudio de la resistencia a la insulina. Mientras que la resistencia a la insulina asociada a la obesidad constituye una alteración patológica, la gestación ofrece para el estudio la ventaja de una modulación fisiológica, dual y seriada, aumentando primero y disminuyendo después la sensibilidad a la insulina. De hecho, la gestación es un estado que se caracteriza por alteraciones fisiológicas en la sensibilidad a la insulina que garantizan la adecuada distribución de sustratos entre la madre y los fetos en cada momento del proceso. Así, durante la gestación hay un aumento constante del peso corporal (Abelenda & Puerta, 1987, Herrera *et al.*, 2000). Las demandas incrementadas de sustratos por parte de los fetos son abastecidas por la madre en forma de glucosa y cuerpos cetónicos. Con este fin, la sensibilidad a la insulina cambia desde un estado intensificado durante la fase conocida como parte anabólica de la gestación (dos primeras semanas), a un estado de resistencia que re-dirige los sustratos desde la madre hacia los fetos. En la fase resistente a la insulina, hay una gluconeogénesis hepática incrementada y una menor captación de glucosa en músculo y tejido adiposo (Leturque *et al.*, 1987, Leturque *et al.*, 1986, Okuno *et al.*, 1993, Yanase *et al.*, 1997). Simultáneamente, la termogénesis del tejido adiposo pardo es inhibida de modo que se reducen las demandas energéticas de la madre (Abelenda & Puerta, 1987, Andrews *et al.*, 1986).



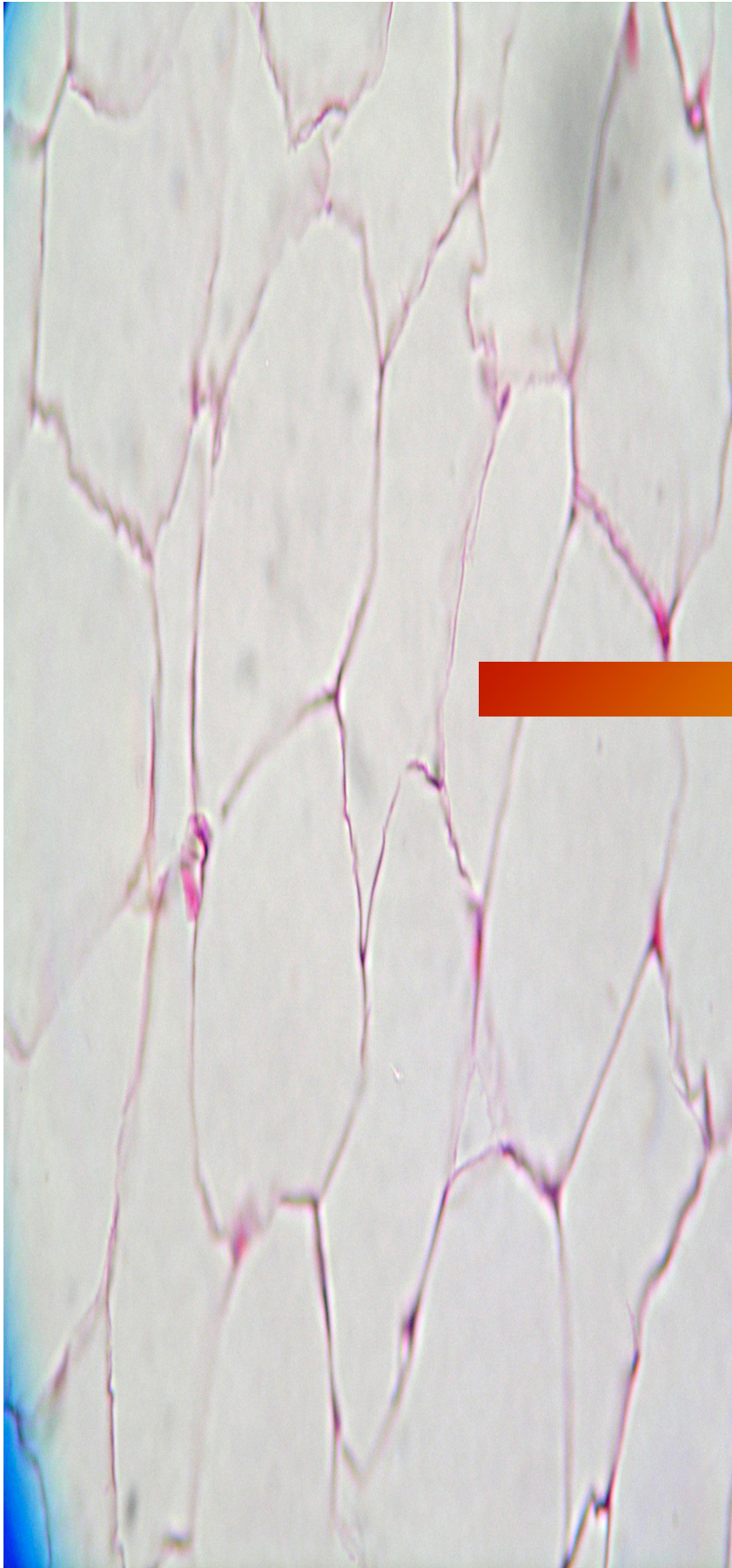
OBJETIVOS

Objetivos



De acuerdo con lo ya introducido y basándonos en el conocimiento del tema hasta la fecha de realización del presente trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Comprobar que en nuestro modelo experimental, la rata Wistar gestante, tienen lugar los cambios de sensibilidad a la insulina publicados por otros autores.
2. Determinar los niveles de adiponectina durante la gestación, para así relacionarlos con los cambios ocurridos en la sensibilidad a la insulina y la masa de la WAT.
3. Determinar los niveles de resistina durante la gestación, para así relacionarlos con los cambios ocurridos en la sensibilidad a la insulina y la masa de la WAT.
4. Determinar los niveles de TNF- α e IL-6 durante la gestación, para así relacionarlos con los cambios ocurridos en la sensibilidad a la insulina y la masa de la WAT.
5. De los resultados obtenidos, surgió la necesidad de analizar el papel de las hormonas relacionadas con la gestación en los cambios observados en la resistina.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y Discusión



I. Resultados

Bajo el siguiente apartado se describen los resultados obtenidos, así como una discusión de los mismos. A efectos prácticos y para dar respuesta a los objetivos planteados se realizaron los siguientes experimentos: síntesis, liberación y concentraciones de las adipocinas (adiponectina, resistina, TNF- α e IL-6) en la rata a lo largo de la gestación y la modulación de la resistina por parte de las hormonas implicadas en la reproducción. En todos los experimentos realizados, se especifica la revista en la que han sido publicados o en que momento del proceso de publicación se encuentran. Por otro lado, en algunos casos los datos presentados en cada experimento han sido completados con otros resultados en un epígrafe especial al final del artículo.

Así pues, los experimentos realizados son:

1. Expresión y concentraciones extracelulares de la adiponectina durante la gestación.
2. Expresión y concentraciones extracelulares de la resistina durante la gestación.
3. Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.
4. Modulación de la resistina por parte de las hormonas implicadas en reproducción.

Resultados y Discusión

5. Síntesis y liberación de la IL-6 y del TNF- α en la WAT, sus concentraciones en el suero y en el líquido cefalorraquídeo.
6. Otros datos no publicados.

Resultados y Discusión

1. Expresión y concentraciones extracelulares de la adiponectina durante la gestación.

Adiponectin values are unchanged during pregnancy in rats . J Endocrinol Invest. 2005 Jul-Aug;28(7):609-15

La adiponectina se ha considerado como un factor que determina la sensibilidad a la insulina. Se sabe, que dicha sensibilidad cambia de un estado aumentado al comienzo de la gestación, a un estado reducido al final de la misma. Se ha propuesto un papel, en el ratón, para estos cambios de la adiponectina aunque se ha cuestionado en los humanos. Así pues, medimos la expresión de la adiponectina en la rata en los depósitos viscerales y subcutáneos, estudiando el contenido y la liberación de la hormona en ratas no gestantes y gestantes en los días 8, 15 y 19 de gestación. También se determinó su concentración en el suero. Nuestros resultados indican que no existen diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos entre las ratas no gestantes y gestantes en ningún día de la gestación, a pesar de los cambios en la masa del tejido adiposo blanco y de la sensibilidad a la insulina. La adiponectina se detectó en el líquido cefalorraquídeo de ratas gestantes y no gestantes en concentraciones 1000 veces menores que en el suero, pero nuevamente no se encontraron diferencias significativas. En este estudio concluimos, que la adiponectina no juega papel alguno en la regulación de los cambios de la sensibilidad a la insulina durante la gestación en la rata.

Adiponectin values are unchanged during pregnancy in rats

S. Caja, M. Torrente, I. Martínez, M. Abelenda, and M. Puerta

Department of Animal Physiology II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University, Madrid, Spain

ABSTRACT. Adiponectin is believed to be a key factor in determining insulin sensitivity. In turn, insulin sensitivity is known to change from an enhanced state in early pregnancy to a reduced one in late pregnancy. A role for adiponectin in these changes has been proposed for mice but questioned for humans. We addressed this issue in rats by measuring adiponectin expression in both visceral and subcutaneous white adipose tissue, together with tissue content and release of the hormone in non-pregnant and in pregnant rats by days 8, 15 and 19 of pregnancy. Plasma concentration was also determined. No dif-

ferences were found in any of the parameters measured between non-pregnant and pregnant rats at any time of pregnancy despite changes in white adipose tissue mass and insulin sensitivity. Adiponectin was also detected in cerebrospinal fluid at a concentration 1,000 times lower than in plasma, but again no differences were found between non-pregnant and pregnant animals. It is concluded that adiponectin does not play any role in regulating changes in insulin sensitivity during pregnancy in rats.

(J. Endocrinol. Invest. 28: 609-615, 2005)
©2005, Editrice Kurtis

INTRODUCTION

Traditional views of white adipose tissue (WAT) as a passive lipid storage organ have changed to a broader perspective, following the recognition that white adipocytes release a wide range of signalling molecules, the physiological significance of many of which is unknown (1-3). Adiponectin is expressed by adipocytes and has been detected in plasma of both rodents and humans (4, 5). Initially described as Acrp30 (4), it is also known as ApM1(6), AdipoQ (7) and GBP28 (8). It was linked to energy balance after the observation of both a diminished expression in WAT and decreased plasma levels in several obese rodent models and in humans (5, 7, 9). Elevation of plasma levels of adiponectin after direct administration of the molecule or of insulin sensitizers (such as thiazolidinediones) improves insulin sensitivity and reduces hyperglycemia in insulin-resistant animal models (10-12). In lipotrophic mice, adiponectin

reverses partially insulin resistance (13), and the protective role of the protein was confirmed with the adiponectin-null mice (14, 15). In a longitudinal study in the Rhesus monkey, a species that develops insulin resistance on aging, adiponectin plasma concentration declined in parallel with the appearance of insulin resistance (16). In humans, high levels of adiponectin are protective against the development of insulin resistance (17). Taken together all these observations have made adiponectin to be considered as a major modulator of insulin action.

During pregnancy, there is a continuous increase in body weight (18, 19), but the relative contribution to this increase from the maternal and fetal tissues varies throughout pregnancy. During the first two weeks of pregnancy, most of the body weight increase is due to maternal growth whereas in the last week maternal body weight stabilizes – or even decreases the day before labor – and fetal growth accounts for the increase in body weight (20, 21). The enhanced substrate demand of the fetuses is supplied by the mother primarily in the form of glucose or ketone bodies. To that end, an insulin-resistant state ensues, which allows enhanced hepatic gluconeogenesis and reduced glucose uptake in maternal muscle and WAT (22-25), thereby resulting in the maximum channeling of glucose to the fetuses. Therefore, pregnancy is a suitable model for studying natural changes in insulin sensitivity and the related endocrine factors.

Key-words: Cerebrospinal fluid, insulin sensitivity, plasma, white adipose tissue.

Correspondence: M. Puerta, PhD, Department of Animal Physiology II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University, c/ José Antonio Novais 2 28040 Madrid, Spain.

E-mail: mpuerta@bio.ucm.es

Accepted February 14, 2005.

Resultados y Discusión

S. Caja, M. Torrente, I. Martínez, et al.

J. Endocrinol. Invest. 28: 609-615, 2005
©2005, Editrice Kurtis.

Pregnancy leads to a reduction in plasma adiponectin in mice which agrees with a role as an insulin sensitizer (26, 27). None the less, in women adiponectin concentrations did not differ in third trimester pregnancy and post-partum samples which argues against such a role (28). We address this issue in another species, namely rats, hypothesizing differences between rodents and humans. Contrary to our expectations, we did not find any change in adiponectin related values with pregnancy in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female Wistar rats weighing 180-200 g were housed at 22 C in individual cages with water and food (A04 Panlab, Spain) freely available, and with a 12 h light/12 h dark cycle (lights on at 8:00 h). The stage of the estrus cycle was assessed daily to determine the reproductive status of the animals. In the morning of estrus, a female was housed with a male for 4 h. Mating was indicated by the presence of sperm in the vaginal smears. The day of mating was considered as day 0 of pregnancy. Virgins rats at diestrus II were used as representing day 0 of pregnancy, i.e. as non-pregnant rats. Animals were cared for and used in accordance with the principles of the Council of European Communities (86/609 EEC).

Sample collection

At days 8, 15 and 19 of pregnancy, animals were killed by decapitation between 10:00-12:00 h. Non-pregnant rats were killed at the same time interval. Just before sacrifice, cerebrospinal fluid (CSF) was obtained under halothane anesthesia by inserting a 23-gauge butterfly needle into the cisterna magna. Only samples without any blood contamination were processed. Trunk blood was collected at the time of decapitation. It was allowed to clot, centrifuged to obtain serum and stored at -80 C until analysis. Parametrial, retroperitoneal and subcutaneous WAT depots from the left side of the animals were quickly removed, frozen in liquid N₂ and stored at -80 C until analysis. The corresponding right side WAT depots together with the periovaric, inguinal and perirenal depots were also removed and weighed.

Adiponectin tissue content

A fragment of parametrial WAT depot was homogenized in phosphate buffer (1 g in 1 ml), centrifuged at 3,400 g and the infranatant was assayed for the hormone.

Adiponectin release

Parametrial WAT was obtained in aseptic conditions, minced with scissors and a fragment of 250 mg incubated at 37 C in 1 ml of Krebs-Ringer-Phosphate (pH 7.4) with glucose (1mg/ml) and albumin (2%). After 8 h of incubation, the medium was recovered and stored at -80 C until analysis.

mRNA detection

WAT samples were homogenized in Ultraspec reagent (Biotex Laboratories, USA), to obtain total cellular RNA, based on the single-step method of Chomczynski and Sacchi (29). The pro-

cedures used for the fractionation, blotting and hybridization of mRNAs together with a chemiluminescence detection protocol were carried out as described previously (30). In outline, RNAs were fractionated by agarose electrophoresis gel, transferred to a positively charged nylon membrane (Roche, Germany) by capillary blotting and cross-linked under UV light. Adiponectin's mRNA was detected using a specific antisense oligonucleotide end-labelled 5' with digoxigenin (Oswell, UK) as previously described (31). The membranes were incubated sequentially with the oligonucleotide and with an anti-digoxigenin FAB/alkaline phosphatase conjugate (Roche, Germany) and then processed essentially as in the protocols provided by the manufacturer. CDP-star® (Roche, Germany) was used as the chemiluminescence substrate. Signals were obtained by X-ray film exposure of the membrane (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK). Membranes were stripped and reprobed for 18S rRNA to adjust for any differences in the loading and transfer of RNA during blotting. 18S rRNA was detected using a 31-mer antisense oligonucleotide probe, as previously described (32).

Adiponectin detection

Serum adiponectin levels were measured with the mouse radioimmunoassay kit developed by Linco (USA), which is also suitable for rats. The limit of sensitivity was 1 ng/ml and the limit of linearity 100 ng/ml. The intra-assay coefficients of variation provided by the manufacturer were 3.73 and 4.11% for serum samples containing 3 and 8 µg/ml, respectively. The inter-assay coefficients of variation provided by the manufacturer were 8.24 and 6.56% for serum samples containing 3 and 8 µg/ml, respectively. According to the assay procedure, serum samples were diluted 1:1000 with assay buffer, prior to analysis. CSF was analyzed without dilution. Infranatants of tissue extracts were analyzed without any dilution whereas incubation medium of WAT fragments were diluted 100 times.

Insulin tolerance test (ITT)

Rats fasted for 2 h were injected i.p. with insulin (human insulin, Lilly, Spain, 0.2 IU/100 g b.w.) between 12:00-13:00 h. Blood samples (50-60 µl) were collected by tail snip at 0 min (just before insulin injection) and at 15, 30, 45, 60 and 120 min after injection. Immediately, serum was separated and glucose analyzed by the GOD-POD method by using diagnostic reagent kit (Spinreact, Spain). The glucose disappearance rate (K_{ITT}) was calculated using the formula 0.693 (t_{1/2}) (33). The plasma glucose half-life (t_{1/2}) was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentration during the linear decay phase. It has been previously shown a high degree of correlation between the ITT and clamp studies used to determine insulin sensitivity (34).

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) with time of pregnancy as a factor - non-pregnant rats representing day 0 of pregnancy - was used for comparing WAT depots mass, K_{ITT}, plasma and CSF adiponectin, the O.D. of the bands corresponding to adiponectin in Northern blots, adiponectin release in parametrial WAT incubations and adiponectin content in parametrial WAT depot. A Student-Newman-Keuls test was used for post-hoc comparisons. A two-ways ANOVA for repeated measures was used for comparing body weight of pregnant and non-pregnant

Resultados y Discusión

J. Endocrinol. Invest. 28: 609-615, 2005
©2005, Editrice Kurtis.

animals (pregnancy and time were the between-subject factor and within-subject factor, respectively). Pairwise comparisons were done after Bonferroni method. $p < 0.05$ was considered as statistically significant throughout.

RESULTS

Pregnant rats showed a bigger body weight gain than non-pregnant animals even in early pregnancy (day 8) (Fig. 1). Changes in main fat pads are depicted in Figure 2. It shows how during the 15 first days of pregnancy there are no significant changes in fat mass in the five WAT depots considered. However, during the last 4 days considered - interval 15-19 days - there was a trend to increase fat mass which attained statistical differences in parametrial, periovaric and retroperitoneal depots. Indeed, fat mass in day 19 was significantly higher than in day 15 when the five WAT depots were considered as a whole. Figure 3 shows that insulin sensitivity - as deduced from the glucose disappearance rate after an insulin

Adiponectin in pregnant rats

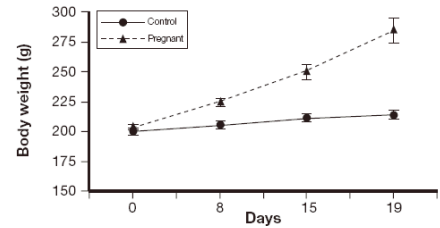


Fig. 1 - Changes in body weight during pregnancy. A group of non-pregnant rats with similar body weight at the beginning of the experiment was used as control. Data are expressed as mean values \pm SEM of 8 animals. A two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures revealed $p < 0.000$ for pregnancy and for time with pairwise comparisons done by the Bonferroni method.

injection - changed during pregnancy as expected. Thus, K_{ITT} was higher by day 8 than by day 0. Later on, it was decreasing to reach the lowest level by day 19.

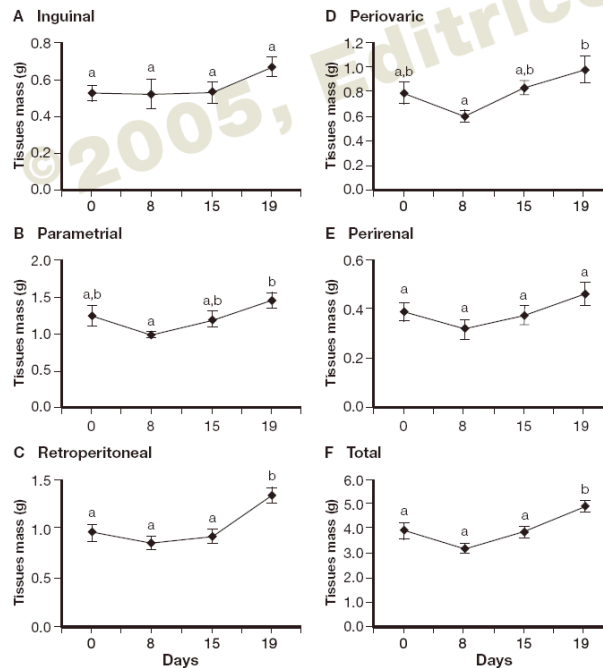


Fig. 2 - Changes in fat mass in visceral white adipose tissue (WAT) depots in non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times of pregnancy. Each point represents mean \pm SEM of 8 rats. Different superscript letter means $p < 0.05$ when analysed by a one-way analysis of variance (ANOVA) using SNK test for post-hoc comparisons.

Resultados y Discusión

S. Caja, M. Torrente, I. Martínez, et al.

J. Endocrinol. Invest. 28: 609-615, 2005
©2005, Editrice Kurtis.

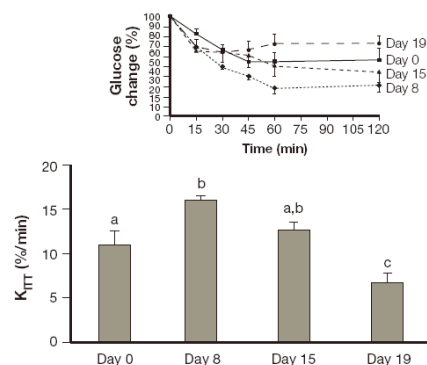


Fig. 3 - Glucose disappearance rate (K_{ITT}) after an i.p. insulin injection in non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times of pregnancy. Bars represent mean \pm SEM of 5-7 animals. Different superscript letter means $p < 0.05$ when analysed by a one-way analysis of variance (ANOVA) using SNK test for post-hoc comparisons. The insert shows the time-course of the changes in plasma glucose concentration indicated as per cent of the initial concentration (such initial values were 138 ± 8 , 129 ± 8 , 98 ± 4 and 86 ± 3 mg/ml for day 0, 8, 15 and 19, respectively).

Figure 4 shows representative Northern blots of adiponectin mRNA at different times of pregnancy together with their relative abundance – depicted as arbitrary units. Three depots were analyzed, parametrial, retroperitoneal and subcutaneous. The one-way ANOVA did not reveal any difference among the 4 times considered in any depot.

Tissue content of adiponectin was measured in homogenates of parametrial WAT of both non-pregnant and pregnant rats at three different times of pregnancy. Figure 5A shows that no differences were found among the 4 groups of rats by means of a one-way ANOVA.

Figure 5B depicts the release of adiponectin to the incubation medium of pieces of parametrial WAT obtained from both non-pregnant and pregnant rats at different times of pregnancy. Again, no statistical differences were revealed among groups by means of a one-way ANOVA.

Finally, adiponectin concentration was measured in both plasma and CSF of pregnant and non-pregnant rats. Adiponectin was present in similar concentration in the plasma of the four groups of rats considered, irrespective the time of pregnancy (Table 1). Adiponectin was also detected in CSF but at concentration 1000 times lower than in plasma (Table 1). Again, adiponectin CSF concentration was similar in non-pregnant and pregnant animals.

DISCUSSION

During pregnancy, there is maternal and fetal growth brought about by a substantial increase in food intake and substrate re-partitioning (18, 19). To this end, maternal insulin sensitivity changes from an enhanced state during early pregnancy, allowing maternal growth, to an insulin resistant state in late pregnancy which diverts substrates away from the mother for fetal growth (22, 23). These adjustments in insulin sensitivity were also found in the pregnant

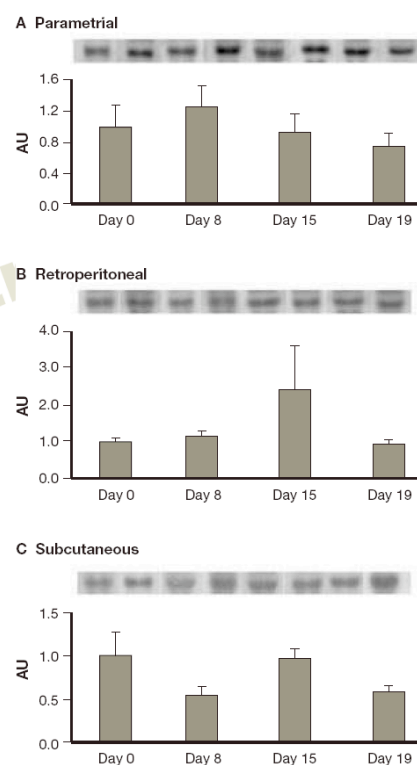


Fig. 4 - Adiponectin mRNA levels in different white adipose tissue (WAT) depots of non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times of pregnancy. Fat pads were removed, RNA extracted and Northern blots probed for adiponectin mRNA and 18S rRNA. Representative blots of adiponectin mRNA are shown in each panel together with the relative abundance of mRNA. Bars represent mean \pm SEM of 6-8 animals. One-way analysis of variance (ANOVA) did not reveal statistical differences. AU: arbitrary units.

612

Resultados y Discusión

J. Endocrinol. Invest. 28: 609-615, 2005
©2005, Editrice Kurtis.

Adiponectin in pregnant rats

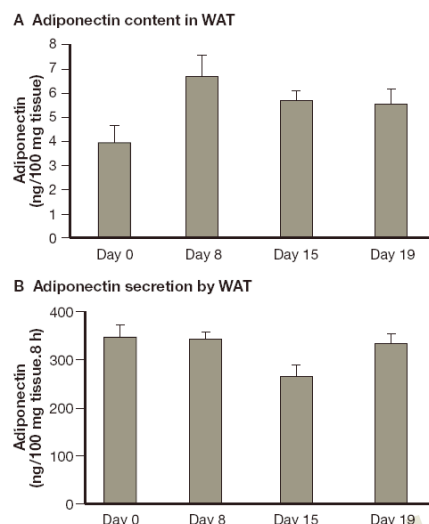


Fig. 5 - Adiponectin content and release from parametrial white adipose tissue (WAT) of both non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times of pregnancy. A) A fragment of parametrial WAT was removed, homogenized in phosphate buffer and adiponectin was measured in the infranatant after centrifugation to eliminate lipids. B) A fragment of parametrial WAT was removed and incubated for 8 h. Adiponectin was measured in the incubation medium. Bars represent mean \pm SEM of 6-8 animals. One-way analysis of variance (ANOVA) did not reveal statistical differences in any case.

rats of this study, that showed an increase in insulin sensitivity in the first week of pregnancy but a decrease in the last one (Fig. 3).

Accretion of fat mass has been shown to lead to changes in the expression and plasma concentration of adiponectin. In fact, ob/ob mice (7, 9), fatty Zucker rats (35) and obese humans (5, 9) show lower adiponectin expression and plasma concentration than their lean counterparts. As our results show, during late pregnancy there is a significant enlargement of the WAT depots (Fig. 2) so that a decrease in mRNA was expected. Nonetheless, no change in adiponectin mRNA levels were found not only in subcutaneous WAT - which is known to have a lower expression than visceral (35) - but also in visceral fat (parametrial and retroperitoneal). In agreement with these results, no change in plasma concentration was also recorded at any time of pregnancy (Table 1). Even more, adiponectin content in parametrial

WAT was similar in virgin controls and in pregnant animals at any time of pregnancy as well as the tissue release of the hormone (Fig. 5). In short, we did not observe any difference between non-pregnant and pregnant rats in any of the adiponectin related values. Therefore, it is difficult to propose any role for adiponectin in changing insulin sensitivity during pregnancy in rats as it was proposed for mice (26, 27). On the contrary, present results agree with observations in humans where no differences were found in plasma adiponectin between third trimester pregnancy and post-partum samples (28). Thus, this study suggests no role for adiponectin in regulating insulin sensitivity during pregnancy in rats. It does not rule out any effect in other species, as claimed for mice or in some clinical complications during pregnancy as in gravid women with diabetes mellitus (36, 37).

Adiponectin was also found in the CSF of virgin controls, but at 1000 times lower concentration than in plasma. It suggests that the hormone crosses the blood brain barrier and could conceivably have a central role. The concentration gradient between plasma and CSF for adiponectin is much higher than that found for leptin, which is only 10 times in the case of rats (38, 39). The very high concentration gradient in the case of adiponectin suggests that there are very efficient mechanisms for controlling its access to the brain and we cannot discount the possibility that the hormone present in CSF reflects 'leakage' rather than a regulated uptake.

Recently, it has been shown that insulin sensitivity in peripheral tissues is influenced by central mechanisms (40-42). CSF adiponectin in pregnant rats was unchanged with respect to non-pregnant animals. So whatever the role of adiponectin in brain, it seems to be unaltered by pregnancy which reinforces our previous conclusion that adiponectin

Table 1 - Adiponectin concentration in plasma and in cerebrospinal fluid of non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times of pregnancy.

	Plasma (μ g/ml)	CSF (ng/ml)
Non-pregnant		
Day 0	6.7 \pm 0.5 (22)	5.7 \pm 0.7 (14)
Pregnant		
Day 8	6.1 \pm 0.3 (8)	4.6 \pm 0.3 (8)
Day 15	6.5 \pm 0.4 (7)	4.3 \pm 1.2 (8)
Day 19	7.9 \pm 0.7 (14)	3.3 \pm 1.0 (10)

Data are expressed as mean \pm SEM of the number of animals indicated in parenthesis. One-way analysis of variance (ANOVA) did not reveal statistical differences.

613

Resultados y Discusión

S. Caja, M. Torrente, I. Martínez, et al.

J. Endocrinol. Invest. 28: 609-615, 2005
©2005, Editrice Kurtis.

does not play any role in regulating insulin sensitivity in pregnant rats. This conclusion gives way to other adipokines as potential factors for regulating insulin sensitivity during pregnancy in rats. In this respect, it should be mentioned that plasma resistin - another adipokine related to glucose metabolism (43) - is increased at the end of pregnancy (44). In conclusion, adiponectin expression in WAT, tissue content, release, plasma and CSF concentration are similar in non-pregnant and pregnant rats at any time of pregnancy despite changes in insulin sensitivity. Accordingly, adiponectin does not seem to play any role in governing insulin sensitivity in pregnant rats.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants PR1/03-11658 from UCM, 08.6/0013.1/2003 from Comunidad de Madrid and BFI2003-01414 from MCyT given to Mañisa Puerta.

REFERENCES

- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell AM. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol* 2001, 280: E827-47.
- Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001, 60: 329-39.
- Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 2004, 30: 13-9.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995, 270: 26746-9.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 257: 79-83.
- 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). *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 221: 286-9.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996, 271: 10697-703.
- Yoda M, Nakano Y, Tobe T, Shioda S, Choi-Miura NH, Tomita M. Characterization of mouse GBP28 and its induction by exposure to cold. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001, 25: 75-83.
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 1595-9.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001, 7: 947-53.
- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentration of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001, 50: 2094-9.
- Yamauchi T, Hara K, Kubota N, et al. Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2003, 3: 243-54.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001, 7: 941-6.
- Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002, 277: 25863-6.
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002, 8: 731-7.
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during progression to type 2 diabetes in Rhesus monkeys. *Diabetes* 2001, 50: 1126-33.
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003, 361: 226-8.
- Herrera E, Lasunción MA, Huerta L, Martín-Hidalgo A. Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biol Neonate* 2000, 78: 315-20.
- Abelenda M, Puerta M. Inhibition of diet-induced thermogenesis during pregnancy in the rat. *Pflügers Arch* 1987, 409: 314-7.
- Herrera E, Lasunción MA, Palacín M, Zorzano A, Bonet B. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* 1991, 40: 83-8.
- González C, Fernández Díaz BB, Fernández S, Patterson AM. Pregnancy in rats and food restriction (50%): insulin response in relation to serum lipids and lipoprotein levels. *Nutr Res* 1998, 18: 1235-44.
- Leturque A, Ferré P, Burnol AF, Kande J, Maulard P, Girard J. Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* 1986, 35: 172-7.
- Leturque A, Hauguel S, Ferré P, Girard J. Glucose metabolism in pregnancy. *Biol Neonate* 1987, 51: 64-9.
- Okuno S, Maeda Y, Yamaguchi Y, et al. Expression of GLUT4 glucose transporter mRNA and protein in skeletal muscle and adipose tissue from rats in late pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 191: 405-12.
- Yanase S, Sugiyama T, Sugaya A, Shen XX, Minoura H, Toyoda N. Hexokinase II activity and messenger ribonucleic acid abundance in adipose tissue and skeletal muscle during pregnancy and lactation in rats. *Am J Obstet Gynecol* 1997, 176: 651-5.
- Combs TP, Berg AH, Rajala MW, et al. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003, 52: 268-76.

Resultados y Discusión

J. Endocrinol. Invest. 28: 609-615, 2005
©2005, Editrice Kurtis.

Adiponectin in pregnant rats

27. Kondo E, Sugiyama T, Kusaka H, Toyoda N. Adiponectin mRNA levels in parametrial adipose tissue and serum adiponectin levels are reduced in mice during late pregnancy. *Horm Metab Res* 2004, 36: 465-9.
28. Ramsay JE, Jamieson N, Greer IA, Sattar N. Paradoxical elevation in adiponectin concentrations in women with preeclampsia. *Hypertension* 2003, 42: 891-4.
29. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162: 156-9.
30. Trayhurn P, Duncan JS, Nestor A, Thomas MEA, Rayner DV. Chemiluminescent detection of mRNAs on northern blots with digoxigenin end-labelled oligonucleotides. *Anal Biochem* 1994, 222: 224-30.
31. Puerta M, Abelenda M, Rocha M, Trayhurn P. Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissues. *Horm Metab Res* 2002, 34: 629-34.
32. Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV. Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* 1995, 311: 729-33.
33. Lundbaek K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* 1962, 5291: 1507-13.
34. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1989, 68: 374-8.
35. Altomonte J, Harbaran S, Richter A, Dong H. Fat depot-specific expression of adiponectin is impaired in Zucker fatty rats. *Metabolism* 2003, 52: 958-63.
36. Worda C, Leipold H, Gruber C, Kautzky-Willer A, Knofler M, Bancher-Todesca D. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2004, 191: 2120-4.
37. Thyfault JP, Hedberg EM, Anchan RM, et al. Gestational diabetes is associated with depressed adiponectin levels. *J Soc Gynecol Investig* 2005, 12: 41-5.
38. Grueso E, Rocha M, Puerta M. Plasma and cerebrospinal fluid leptin levels are maintained despite enhanced food intake in progesterone-treated rats. *Eur J Endocrinol* 2001, 144: 659-65.
39. Rocha M, Grueso E, Puerta M. The anorectic effect of oestradiol does not involve changes in plasma and cerebrospinal fluid leptin concentrations in the rat. *J Endocrinol* 2001, 171: 349-54.
40. Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M, Shimazu T. Role of sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* 1999, 48: 1706-12.
41. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptors in the control of body weight and reproduction. *Science* 2000, 289: 2122-5.
42. Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rosetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 2002, 5: 566-72.
43. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004, 303: 1195-8.
44. Caja S, Martínez I, Abelenda M, Puerta M. Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats. *J Endocrinol* 2005, 185: 551-9.

Resultados y Discusión

2. Expresión y concentraciones extracelulares de la resistina durante la gestación.

Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats. Journal of Endocrinology (2005) 185, 551-559

La resistina se ha propuesto como un factor antiadipogénico e inductor de la resistencia a la insulina. Al final de la gestación, la masa de la WAT aumenta mientras que la sensibilidad a la insulina decrece. Para determinar la participación de la resistina en estos procesos, medimos la proteína en el suero de ratas gestantes, no gestantes y madres en lactancia. La resistina, en el suero se incrementó en el día 15 de gestación permaneciendo elevada 5 días tras el parto. El incremento en la concentración de resistina en el suero y la disminución en la sensibilidad a la insulina se vio que transcurrían en paralelo. La expresión de resistina aumentó de 5-15 veces en los depósitos de grasa blanca visceral en el día 8 de gestación, pero fue similar a los valores de las pregestantes a día 19. La expresión de resistina en la placenta y glándula mamaria fue similar a la encontrada en el depósito parametrial a día 8, pero casi nula a día 19. Sin embargo, hubo un lapso de tiempo entre el aumento de expresión y la concentración en el suero. La masa del tejido adiposo aumentó sin cambios en el tamaño de los adipocitos, lo que es compatible con un papel antiadipogénico por un aumento en la expresión de resistina. Una inyección de gonadotropina coriónica a las ratas no gestantes incrementó la expresión de resistina en el tejido adiposo blanco, indicando que esta hormona se encuentra implicada en el control de la expresión de resistina. La resistina no fue detectada en el líquido cefaloraquídeo. Nuestros resultados sugieren un papel de la resistina en la gestación.

Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats

Sergio Caja, Izaskun Martínez, María Abelenda and Marisa Puerta

Department of Animal Physiology II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University, 28040 Madrid, Spain
(Requests for offprints should be addressed to M Puerta; Email: mpuerta@bio.ucm.es)

Abstract

Resistin has been proposed as both an anti-adipogenic factor and an inducer of insulin resistance. During late pregnancy, white adipose tissue mass increases and insulin sensitivity decreases. To check for the involvement of resistin in these processes, we measured plasma resistin in pregnant and non-pregnant rats and in lactating dams. Plasma resistin increased by day 15 of pregnancy and remained high 5 days post partum. The simultaneous increase in plasma resistin concentration and the decrease in insulin sensitivity is compatible with resistin depressing maternal insulin sensitivity. Resistin expression increased 5–15 times in visceral white adipose tissue depots by day 8 of pregnancy but was similar to pre-pregnancy values by day 19. Resistin expression in the placenta and mammary

gland was similar to that in the parametrial adipose depot by day 8 but was almost null by day 19. There was therefore a time-lag between the peaks in expression and in plasma concentration. White adipose tissue mass increased without changes in adipocyte size once peaks in resistin expression had passed, which is compatible with an anti-adipogenic role for enhanced resistin expression. A bolus injection of chorionic gonadotrophin – which peaks in early pregnancy – to non-pregnant rats increased resistin expression in white adipose tissue, indicating that this hormone is involved in controlling resistin expression. Resistin was not detected in cerebrospinal fluid. Our results have suggested a role for resistin in pregnancy.

Journal of Endocrinology (2005) **185**, 551–559

Introduction

The traditional view of white adipose tissue (WAT) as a passive lipid storage organ has changed to a broader perspective following the recognition that white adipocytes release a wide range of signalling molecules. The physiological significance of many of these signalling molecules remains unknown (Frühbeck *et al.* 2001, Trayhurn & Beattie 2001, Guerre-Millo 2004). One of these bioactive peptides, collectively termed adipokines, is resistin. Resistin was originally described as FIZZ3 (Holcomb *et al.* 2000). Soon afterwards, Kim *et al.* (2001) identified it as an adipocyte-secreted factor that inhibits adipocyte differentiation *in vitro*. Simultaneously, Steppan *et al.* (2001) proposed it as a factor in the development of insulin resistance and renamed it resistin. This followed the observation that increases in expression and plasma levels occur in several models of obesity while the immunoneutralisation of plasma resistin with specific antibodies or a decrease in plasma levels with thiazolidinediones improved insulin action (Steppan *et al.* 2001). Moreover, administration of resistin to mice or rats induces insulin resistance (Steppan *et al.* 2001, Rajala *et al.* 2003). However, the contrasting observation of diminished resistin

expression in the WAT of obese animals (Juan *et al.* 2001, Le Lay *et al.* 2001, Moore *et al.* 2001, Way *et al.* 2001, Fujita *et al.* 2002, Milan *et al.* 2002) together with the inhibition of expression by insulin in 3T3-L1 cells (Haugen *et al.* 2001, Shojima *et al.* 2002) has cast doubt on the role of resistin in the development of insulin resistance. Additionally, in some physiological states related with an altered insulin sensitivity, no changes in resistin expression have been found (Bing *et al.* 2002, Gomez-Ambrosi *et al.* 2002, Puerta *et al.* 2002). Nonetheless, mice lacking resistin show reduced hepatic glucose production, suggesting a role for resistin in glucose metabolism (Banerjee *et al.* 2004).

During pregnancy, maternal and foetal growth is enabled by a substantial increase in food intake and substrate re-partitioning (Abelenda & Puerta 1987, Herrera *et al.* 2000). To this end, maternal insulin sensitivity evolves from an enhanced state during early pregnancy, allowing maternal growth, to an insulin-resistant state in late pregnancy, diverting substrates away from the mother for foetal growth. This latter 'catabolic state' (for the mother) is present during the last third of pregnancy (Leturque *et al.* 1986, 1987). Pregnancy is therefore a suitable model for studying natural changes in insulin sensitivity and the

Resultados y Discusión

552 S CAJA and others · *Resistin in pregnant rats*

related endocrine factors. On the other hand, WAT depots increase their mass during pregnancy (Rocha *et al.* 2003), so it is also a suitable model for studying adipogenesis. The aim of this paper was to test whether resistin expression or plasma concentration change during pregnancy and, if so, to relate those changes to corresponding alterations in insulin sensitivity and WAT mass.

Materials and Methods

Animals

Female Wistar rats weighing 180–200 g were housed at 22 °C in individual cages, with water and food (A04, Panlab, Barcelona, Spain) freely available and with a 12 h light:12 h darkness cycle (lights on at 0800 h). The stage of the oestrous cycle was assessed daily to determine the reproductive status of the animals. To obtain pregnant animals or dams, a female was housed with a male for 4 h on the morning of oestrus. Mating was indicated by the presence of sperm in the vaginal smears. The day of mating was considered day 0 of pregnancy. Non-pregnant rats at di-oestrus were used to represent day 0 of pregnancy. Animals were cared for and used in accordance with the principles of the Council of European Communities (86/609 EEC).

Sample collection

At days 0, 8, 15 and 19 of pregnancy, animals were killed by decapitation between 1000 and 1200 h. Just before they were killed, cerebrospinal fluid (CSF) was obtained under halothane anaesthesia by inserting a 23 gauge butterfly needle into the cisterna magna. Only samples with no blood contamination were processed. Trunk blood was collected at the time of decapitation, allowed to clot, centrifuged to obtain serum and stored at –80 °C until analysis.

Samples of parametrial, retroperitoneal and subcutaneous WAT depots from the left side of the animals were quickly removed, frozen in liquid N₂ and stored at –80 °C until analysis of resistin expression. A piece of parametrial WAT was immersed in Bouin's fluid for histological examination. The corresponding right-side WAT depots together with the inguinal, periovaric and perirenal depots were also removed and weighed.

In 8- and 19-day pregnant rats, pieces of placenta and mammary gland were also quickly removed and frozen in liquid N₂. In 8-day pregnant rats, the placenta is not fully developed so, for the purposes of comparison, the whole embryo together with the extra-embryonic membranes and the surrounding uterine wall were also collected and frozen. These tissues together are referred to as placenta in the rest of the paper.

A group of pregnant rats was allowed to deliver and a sample of blood from the jugular vein was collected under

halothane anaesthesia at day 5 post partum. Pups were weaned at day 21 and a blood sample was again obtained at days 22 and 30 post partum.

Hormonal administration

A single i.p. injection of human chorionic gonadotrophin (hCG; Sigma, St Louis, MO, USA) was given to a group of non-pregnant rats in di-oestrus II at 0900–0930 h. They were killed 8 or 24 h later. Each animal received 200 IU in 140 µl phosphate-buffered saline. Controls received a similar volume of vehicle.

mRNA detection

WAT, placenta and mammary gland samples were homogenised in Ultraspec reagent (Biotecx Laboratories, Houston, TX, USA) to obtain total cellular RNA, based on the single-step method of Chomczynski & Sacchi (1987). The procedures used for the fractionation, blotting and hybridisation of mRNAs together with a chemiluminescence detection protocol were carried out as described previously (Trayhurn *et al.* 1994). In outline, RNAs were fractionated by agarose electrophoresis gel, transferred to a positively charged nylon membrane (Roche, Mannheim, Germany) by capillary blotting and cross-linked under u.v. light. Resistin mRNA was detected using a specific antisense oligonucleotide end-labelled 5' with digoxigenin (Oswel, Southampton, Hampshire, UK) as previously described (Puerta *et al.* 2002). The membranes were incubated sequentially with the oligonucleotide and with an anti-digoxigenin FAB/alkaline phosphatase conjugate (Roche) and then processed essentially as described in the protocols provided by the manufacturer. CDP-star (Roche) was used as the chemiluminescence substrate. Signals were obtained by X-ray film exposure of the membrane (Hyperfilm ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Bucks, UK). Membranes were stripped and re-probed for 18S rRNA to adjust for any differences in the loading and transfer of RNA during blotting. 18S rRNA was detected using a 31-mer antisense oligonucleotide probe, as previously described (Trayhurn *et al.* 1995).

Histology

WAT samples were placed in Bouin's fluid for 48 h and then stored in 70% alcohol at 4 °C. After dehydration with increasing alcohol concentrations they were embedded in paraffin and sliced into 70 µm sections. They were stained with sequential immersion in haematoxylin and eosin. Adipocyte surface was measured in 150 cells from the same individual using the MetaMorph program (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA, USA).

Serum and CSF resistin

Resistin concentration was measured with the human enzyme immunoassay kit developed by Phoenix

Journal of Endocrinology (2005) **185**, 551–559

www.endocrinology-journals.org

Resultados y Discusión

Pharmaceuticals, Inc. (Belmont, CA, USA) which – according to the manufacturer – recognises rat resistin. Parallelism was tested and the results agreed with both the manufacturer and previous reports using the kit in rats (Chen & Nyomba 2003). Serum was assayed as it was obtained. CSF was assayed either as it was obtained or after being lyophilised and re-dissolved in a 2 times smaller volume of buffer kit.

Insulin tolerance test (ITT)

Rats fasted for 2 h were injected i.p. with insulin (human insulin; 0.2 IU/100 g body weight; Lilly, Alcobendas, Spain) between 1200 and 1300 h. Blood samples (50–60 µl) were collected by tail snip at 0 min (just before insulin injection) and at 15, 30, 45, 60 and 120 min after injection. Serum was immediately separated and glucose analysed with the GOD-POD method by using diagnostic reagent kit (Spinreact, St Esteve de Bas, Gerona, Spain). The glucose disappearance rate (K_{ITT}) was calculated using the formula $0.693(t_{1/2})$ (Lundbaek 1962). The plasma glucose half-life ($t_{1/2}$) was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentration during the linear decay phase. A high degree of correlation between the ITT and clamp studies used to determine insulin sensitivity has been shown previously (Bonora *et al.* 1989).

Statistical analysis

One-way ANOVA with time of pregnancy as a factor – non-pregnant rats representing day 0 of pregnancy – was used for comparing K_{ITT} , WAT depot mass and plasma resistin during pregnancy, adipocyte size and the optical density of the bands corresponding to resistin in Northern blots. A Student–Newman–Keuls (SNK) test was used for post hoc comparisons. One-way ANOVA was also used to analyse the effects of hCG administration. A two-way ANOVA for repeated measures was used for comparing body weight of pregnant and non-pregnant animals (pregnancy and time were the between-subject factor and within-subject factor respectively). Pair wise comparisons were done according to the Bonferroni method. Plasma resistin in dams was analysed by one-factor within-subjects ANOVA. Pair wise comparisons were done according to the Bonferroni method. $P < 0.05$ was considered statistically significant throughout. In the Figures and Tables, differences have been indicated by a superscript so that data with an 'a' are different from those with a 'b' but are the same as 'a,b'.

Results

From early pregnancy (day 8), pregnant rats showed a greater body weight gain than non-pregnant animals

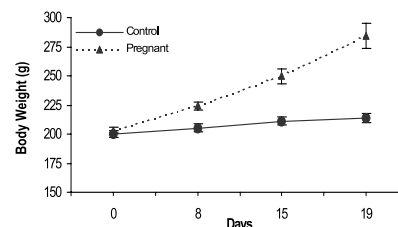


Figure 1 Changes in body weight during pregnancy. A group of non-pregnant rats with similar body weight at the beginning of the experiment was used as control. Data are expressed as mean values \pm S.E.M. of eight animals. A two-way ANOVA for repeated measures revealed $P < 0.000$ for pregnancy and for time with pair wise comparisons done by the Bonferroni method.

(Fig. 1). The number of foetuses was 6–14. Figure 2 shows that insulin sensitivity – as deduced from the glucose disappearance rate after an insulin injection – changed during pregnancy, as expected. Thus, K_{ITT} was higher by day 8 than by day 0. Later on, it decreased to reach the lowest level by day 19.

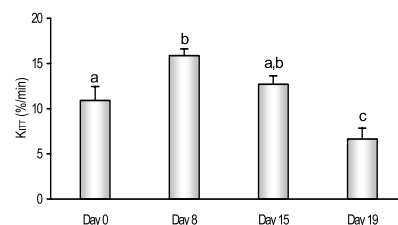
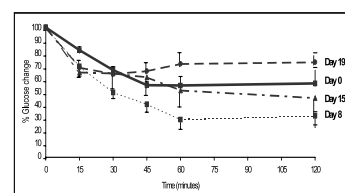


Figure 2 K_{ITT} after an i.p. insulin injection in non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times during pregnancy. Bars represent the mean \pm S.E.M. of five to seven animals. Different superscript letters mean $P < 0.05$ when analysed by a one-way ANOVA using the SNK test for post hoc comparisons. The insert shows the time-course of the changes in plasma glucose concentration indicated as % of the initial concentration (such initial values were 138 ± 8 , 129 ± 8 , 98 ± 4 and 86 ± 3 mg/ml for days 0, 8, 15 and 19 respectively).

Resultados y Discusión

554 S CAJA and others · Resistin in pregnant rats

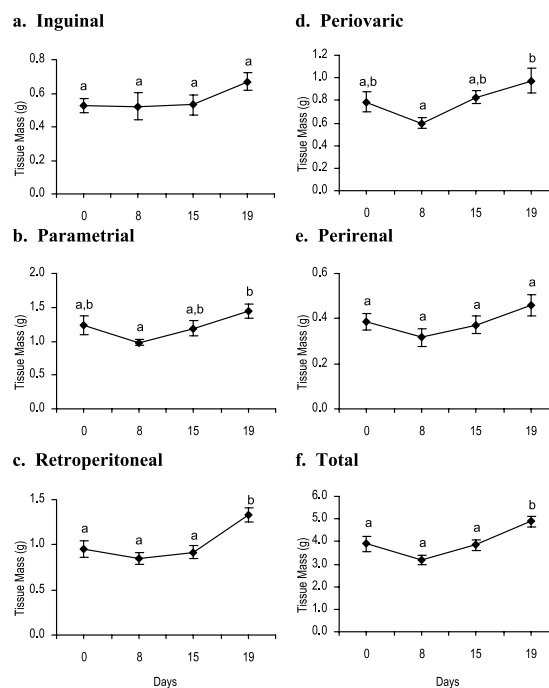


Figure 3 Changes in fat mass in visceral WAT depots in non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times during pregnancy. Each point represents the mean \pm S.E.M. of eight rats. Different superscript letters mean $P < 0.05$ when analysed by a one-way ANOVA using the SNK test for post hoc comparisons.

Changes in main fat pad mass are depicted in Fig. 3 which shows how, during the first 15 days of pregnancy, there were no significant increases in fat mass in the five WAT depots considered – an interval of 15–19 days – there was a trend to increased fat mass. The increase reached statistical differences in parametrial, periovaric and retroperitoneal depots. Indeed, fat mass on day 19 was significantly higher than on day 15, when the five WAT depots were considered as a whole.

The adipocyte size in parametrial WAT of pregnant rats was measured at the times when resistin expression was highest and lowest. A representative microscopic image is shown in Fig. 4 which also shows that no change in adipocyte size took place between days 8 and 19 of pregnancy.

Figure 5 shows representative Northern blots of resistin mRNA at different times during pregnancy, together with their relative abundance – depicted as arbitrary units. Three depots were analysed, the parametrial, retroperitoneal and subcutaneous. A 10–15 times increase was observed in parametrial WAT in early pregnancy. By day 15 it was still 5–10 times higher but it was similar to non-pregnant rats by the end of pregnancy. A 3–5 times increase was also recorded by day 8 in retroperitoneal WAT but no differences from non-pregnant rats were evident by day 15. Subcutaneous WAT did not show any increase in resistin expression in early or mid pregnancy but underwent a reduction by day 19.

Resistin expression was also analysed in tissues related to reproduction; namely, the placenta and mammary gland. The expression in these tissues was compared with that

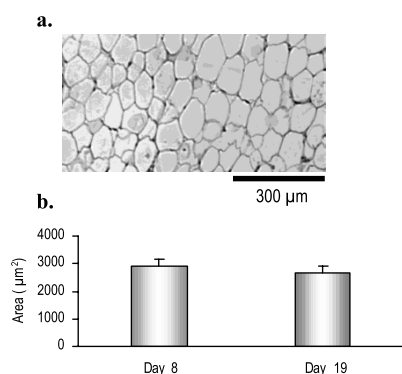


Figure 4 Adipocytes from parametrial WAT of pregnant rats in early and late pregnancy. (a) Representative microscopic image of adipocytes. Pieces of WAT were fixed in Bouin's fluid, dehydrated, embedded in paraffin and stained. (b) Cell size of adipocytes. Bars represent the mean \pm S.E.M. of five to six rats, the value for each rat resulting from counting 150 cells. No differences were found by one-way ANOVA.

obtained in parametrial WAT. Results obtained are depicted in Fig. 6, showing levels of expression in parametrial WAT similar to levels in the placenta and mammary gland in pregnant rats at day 8. However, by day 19 of pregnancy the expression in the placenta and mammary gland was significantly decreased with respect to WAT.

Resistin concentration was measured in plasma at different times during pregnancy and in both lactating and non-lactating dams. Pregnancy altered plasma resistin. By day 8, the resistin concentration in pregnant rats was lower than that of non-pregnant ones but by days 15 and 19 of pregnancy it was higher (Table 1). During early lactation, plasma resistin remained higher (Table 2) but by day 22 post partum – and 1 day after weaning – plasma resistin was similar to that of non-pregnant rats.

CSF was obtained from non-pregnant and pregnant rats but no resistin was detected in CSF either by processing as it was collected or after lyophilisation and redilution in a 2 times smaller volume.

In an attempt to find systemic factors modulating resistin expression and considering that plasma hCG increases and peaks in early pregnancy, hCG was administered to a group of non-pregnant rats. It produced a statistically significant increase in resistin expression in parametrial WAT 24 h after injection (Fig. 7). However, no change in serum resistin was observed at that time (values not shown).

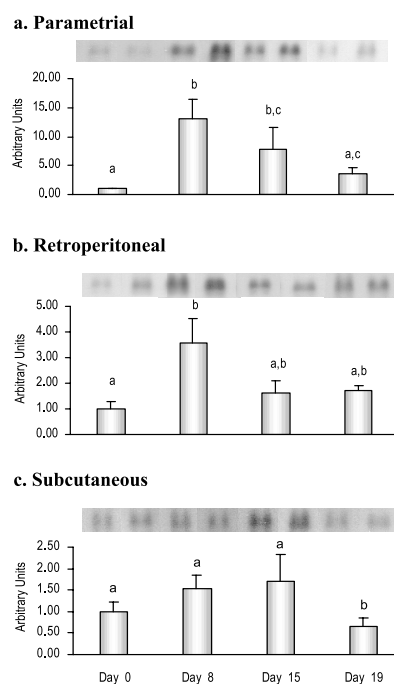


Figure 5 Resistin mRNA levels in different WAT depots of non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times during pregnancy. Fat pads were removed, RNA extracted and Northern blots probed for resistin mRNA and 18S rRNA. Representative blots of resistin mRNA are shown in each panel together with the relative abundance of mRNA. Bars represent the mean \pm S.E.M. of six to eight animals. Different superscript letters mean $P < 0.05$ when analysed by a one-way ANOVA using the SNK test for post hoc comparisons.

Discussion

Discovered 4 years ago in rodent WAT (Holcomb *et al.* 2000), resistin has proven to be one of the most elusive adipokines. Initially proposed as an inhibitory adipogenesis factor (Kim *et al.* 2001) it was soon related to insulin resistance as a causative factor (Steppan *et al.* 2001). Pregnancy is a model of physiologically driven alterations in insulin sensitivity that changes from an enhanced state in the first third of pregnancy to a reduced one in the last third (Leturque *et al.* 1986, 1987). At the same time, an increase in WAT mass takes place during pregnancy

Resultados y Discusión

556 S CAJA and others · *Resistin in pregnant rats*

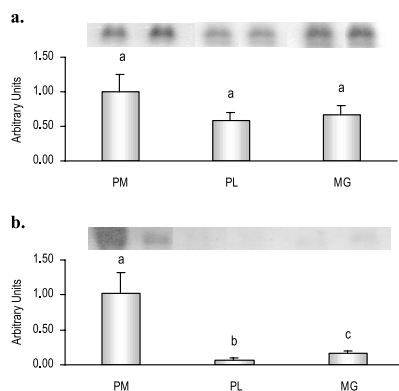


Figure 6 Resistin mRNA levels in parametrial (PM) WAT, placenta (PL) and mammary gland (MG) in (a) 8-day and (b) 19-day pregnant rats. Samples were removed, RNA extracted and Northern blots probed for resistin mRNA and 18S rRNA. Representative blots of resistin mRNA are shown in each panel together with the relative abundance of mRNA. Bars represent the mean \pm S.E.M. of five to six animals. Different superscript letters mean $P < 0.05$ when analysed by a one-way ANOVA using the SNK test for post hoc comparisons.

(Rocha *et al.* 2003). We measured resistin expression in three different WAT depots at three different times during pregnancy. A dramatic increase in resistin expression was found in parametrial (15 times) and in retroperitoneal (4 times) WAT depots by day 8 of pregnancy (Fig. 5). As pregnancy progressed, resistin expression decreased in both depots so that it was similar to that of non-pregnant controls at the end of pregnancy. Since resistin has been found to be expressed in organs other than WAT, i.e. in mouse pituitary (Morash *et al.* 2004), in the mammary gland (Steppan *et al.* 2001, Komatsu *et al.* 2003) and in the human placenta (Yura *et al.* 2003), we also analysed resistin expression in organs developed during pregnancy, namely, the placenta and the mammary gland (Fig. 6).

Table 1 Resistin plasma concentration during pregnancy in rats. Data are expressed as mean values \pm S.E.M. of six to eight animals

	Resistin (ng/ml)
Day 0	29.5 \pm 1.3 ^a
Day 8	23.6 \pm 2.5 ^b
Day 15	40.0 \pm 1.0 ^c
Day 19	37.3 \pm 2.1 ^c

Different superscript letters indicate $P < 0.05$ when analysed by a one-way ANOVA using the SNK test for post hoc comparisons.

Journal of Endocrinology (2005) **185**, 551–559

Table 2 Resistin plasma concentration in dams either lactating or not lactating. Data are expressed as mean values \pm S.E.M. of three to four animals

	Resistin (ng/ml)
Lactating dams	
Day 5 post partum	46.0 \pm 0.1 ^a
Non-lactating dams	
Day 22 post partum	23.7 \pm 1.0 ^b
Day 30 post partum	21.5 \pm 2.6 ^b

Different superscript letters indicate $P < 0.000$ when analysed by a one-factor within-subject ANOVA with pair wise comparisons done by the Bonferroni method.

Resistin expression in both organs was as intense as that found in parametrial WAT by day 8 of pregnancy. However, it turned out to be much smaller than that of WAT by day 19. In other words, resistin expression in early pregnancy was very high in visceral WAT, the placenta and the mammary gland, showing similar levels of expression. As pregnancy progressed, it decreased, reaching basal levels by day 19 in WAT and even lower levels in the placenta and mammary gland. These results contrasted sharply with those obtained for plasma resistin in the same rats (Table 1). In fact, by day 8 of pregnancy – when resistin expression was at its highest level – plasma concentration was even lower than in non-pregnant controls. On the other hand, by day 19 – when resistin expression had returned to pre-pregnancy levels – plasma resistin was dramatically enhanced.

We looked for an explanation for the different time-course changes in resistin expression and plasma resistin by

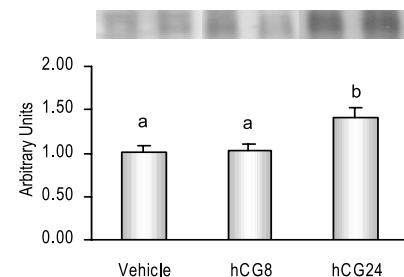


Figure 7 Resistin mRNA levels in parametrial WAT of non-pregnant rats after receiving a single dose of hCG at either 8 h (hCG8) or 24 h (hCG24) after injection. Fat pads were removed, RNA extracted and Northern blots probed for resistin mRNA and 18S rRNA. Representative blots of resistin mRNA are shown in each panel together with the relative abundance of mRNA. Bars represent the mean \pm S.E.M. of six to eight animals. Different superscript letters mean $P < 0.05$ when analysed by a one-way ANOVA using the SNK test for post hoc comparisons.

www.endocrinology-journals.org

analysing the possible contribution of every organ studied to enhancing plasma resistin at the end of pregnancy. In the case of WAT, to explain the inconsistency between low resistin expression and high plasma resistin found in several models of obesity (Steppan *et al.* 2001, Way *et al.* 2001), it has been argued that plasma resistin reflects the total number of adipocytes while resistin mRNA is related to fat cell size (Steppan & Lazar 2002). When we measured the mass of parametrial WAT (Fig. 3), we observed an increase between days 8 and 19 but no change in adipocyte size was recorded (Fig. 4). These observations implied a higher number of adipocytes in late pregnancy with no change in adipocyte size. The increase in plasma resistin in late pregnancy could be due, at least in part, to a higher number of adipocytes.

The contribution of the placenta to enhancing plasma resistin in late pregnancy is doubtful. In fact, although plasma resistin increased by days 15 and 19 of pregnancy, when the placenta is well developed, it remains enhanced 5 days post partum when the placenta was no longer present (Table 2). Opposite results have been found in humans, where both placenta expression and plasma resistin increase at the end of pregnancy, placenta expression being even higher than that of WAT (Sagawa *et al.* 2002, Ryan 2003, Yura *et al.* 2003).

The involvement of the mammary gland in the enhanced plasma resistin concentration in late pregnancy and during lactation is also uncertain. Although plasma resistin levels remained high in lactating dams and fell when suckling pups were separated from their mothers (Table 2), the expression in the mammary gland was so weak at the time of highest plasma levels that it is difficult to support a role for the mammary gland in enhancing plasma resistin concentration in late pregnancy and in lactating dams.

An alternative explanation that could reconcile the delayed peak in plasma resistin with peaks in expression could be either a long delay between synthesis and release or a reduced disappearance from serum (longer half-life) or both. Unfortunately, the present study did not deal with such possibilities. Moreover, this study does not rule out the contribution of other synthesising organs not considered in this work.

What might be the role of the increase in serum resistin in late pregnancy? Despite controversies about the role of resistin in governing insulin sensitivity, administration of resistin to male mice or rats induces insulin resistance (Steppan *et al.* 2001, Rajala *et al.* 2003). It seems, therefore, that the increase in serum resistin in late pregnancy could be a systemic signal to reduce insulin sensitivity, as found in this (Fig. 2) and previous studies. Moreover, plasma resistin remained elevated in lactating dams at peak lactation (day 5 post partum) when insulin sensitivity still remains diminished (Bell & Bauman 1997).

What might be the role of the extremely high increase in resistin expression in visceral fat in early pregnancy?

There is evidence that resistin has an anti-adipogenic role both *in vitro* (Kim *et al.* 2001) and *in vivo* (Kim *et al.* 2004). This paper has shown that WAT mass does not increase during the first 15 days of pregnancy, except in the last week, despite a continuous increase in body weight (Figs 3 and 1 respectively). It has also shown that the adipocyte size in parametrial WAT does not differ between early and late pregnancy. This indicates a higher number of adipocytes at late pregnancy, i.e. adipocyte proliferation (Fig. 4). Thus, when resistin expression is greatly enhanced in visceral fat, no increase in fat mass takes place. These results are compatible with the anti-adipogenic role proposed for resistin. In short, it seems that in early pregnancy not only is there an increase in both food intake (Abelenda & Puerta 1987, Rocha *et al.* 2003) and insulin sensitivity (Fig. 2) to allow maternal growth but an anti-adipogenic state also exists that prevents the deposition in the form of fat of the extra fuels ingested. This anti-adipogenic effect could be carried out by resistin acting locally. No role for the increased resistin expression in the placenta or mammary gland during early pregnancy was evident from the present results.

When we injected hCG into rats, an enhancement in WAT resistin expression was detected (Fig. 7), but no increase in serum resistin took place. Since hCG appears in plasma as soon as pregnancy begins and its concentration peaks in early pregnancy (Lenton *et al.* 1981), our results suggested that this hormone could enhance resistin expression at least in visceral fat, thus avoiding adipogenesis in early pregnancy. Later on, when hCG serum concentration falls, fat deposition for subsequent lactation could occur.

It has been hypothesised that resistin may be an adipose sensor for the nutritional state of animals since fasting reduces its expression in WAT while refeeding increases it (Kim *et al.* 2001, Steppan *et al.* 2001, Bertile & Raclot 2004, Morash *et al.* 2004). Accordingly, it could be a signalling molecule for hypothalamic centres involved in energy balance maintenance. However, we were unable to detect resistin in CSF even when it was concentrated at twice its initial volume. This does not unequivocally prove the absence of resistin in CSF. However, it demonstrates that, if present, its concentration would be lower than in plasma, indicating some sort of regulation for resistin going to the central nervous system.

In conclusion, resistin expression is enhanced in rat visceral fat, the placenta and the mammary gland during early pregnancy when no increase in fat mass takes place. It is suggested that it could act in WAT locally as an adipogenesis suppressor. hCG administration enhances resistin expression in visceral fat and is suggested as the agent responsible for the detected increases. In contrast, serum resistin increases in the third week of pregnancy and remains elevated at peak lactation. It could be responsible for the reduced insulin sensitivity during both pregnancy and lactation. Resistin was not detected in CSF.

Acknowledgments

We thank Dr Marta Torroba for her technical support in the histology and Mr Luis M Alonso and Mr Alfonso Cortés, from the Microscopy and Citometry Center, for their assistance in processing microscopic images. This work was supported by grants PR1/03–11658 from the Universidad Complutense de Madrid, 08-6/0013-1/2003 from the Comunidad de Madrid and BFI2003–01414 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, awarded to M P. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Abelenda M & Puerta M 1987 Inhibition of diet-induced thermogenesis during pregnancy in the rat. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology* **409** 314–317.
- Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE *et al.* 2004 Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* **303** 1195–1198.
- Bell AW & Bauman DE 1997 Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **2** 265–278.
- Bertile F & Raclot T 2004 Differences in mRNA expression of adipocyte-derived factors in response to fasting, refeeding and leptin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1683** 101–109.
- Bing C, Gomez-Ambrosi J, Zabalegui N, Williams G & Trayhurn P 2002 Resistin and RELM- α gene expression in white adipose tissue of lactating mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296** 458–462.
- Bonora E, Moghetti P, Zaccanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corghati A & Muggeo M 1989 Estimates of *in vivo* insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism* **68** 374–378.
- Chen L & Nyomba BL 2003 Glucose intolerance and resistin expression in rat offspring exposed to ethanol *in utero*: modulation by postnatal high-fat diet. *Endocrinology* **144** 500–508.
- Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** 156–159.
- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ & Burrell AM 2001 The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* **280** E827–E847.
- Fujita H, Fujishima H, Morii T, Koshimura J, Narita T, Kakei M & Ito S 2002 Effect of metformin on adipose tissue resistin expression in db/db mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **298** 345–349.
- Gomez-Ambrosi J, Zabalegui N, Bing C, Tisdale MJ, Trayhurn P & Williams G 2002 Weight loss in tumour-bearing mice is not associated with changes in resistin gene expression in white adipose tissue. *Hormone and Metabolic Research* **34** 674–677.
- Guerre-Millo M 2004 Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes and Metabolism* **30** 13–19.
- Haugen F, Jorgensen A, Dreven CA & Trayhurn P 2001 Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters* **507** 105–108.
- Herrera E, Lasunción MA, Huerta L & Martín-Hidalgo A 2000 Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biology of the Neonate* **78** 315–320.
- Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ *et al.* 2000 FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO Journal* **19** 4046–4055.
- Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF & Ho LT 2001 Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289** 1328–1333.
- Kim KH, Lee K, Moon YS & Sul HS 2001 A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* **276** 11252–11256.
- Kim KH, Zhao L, Moon Y, Kang C & Sul HS 2004 Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor (ADSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. *PNAS* **101** 6780–6785.
- Komatsu T, Itoh F, Mikawa S & Hodate K 2003 Gene expression of resistin in adipose tissue and mammary gland of lactating and non-lactating cows. *Journal of Endocrinology* **178** R1–R5.
- Le Lay S, Boucher J, Rey A, Castan Laurell I, Krief S, Ferre P, Valet P & Dugail I 2001 Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289** 564–567.
- Lenton EA, Grudzinskas GJ, Neal LM, Chard T & Cooke ID 1981 Chorionic gonadotropin concentration in early human pregnancy: comparison of specific and nonspecific assays. *Fertility and Sterility* **35** 40–45.
- Leturque A, Ferré P, Burnol AF, Kande J, Maulard P & Girard J 1986 Glucose utilization rates and insulin sensitivity *in vivo* in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* **35** 172–177.
- Leturque A, Hauguel S, Ferré P & Girard J 1987 Glucose metabolism in pregnancy. *Biology of the Neonate* **51** 64–69.
- Lundbaek K 1962 Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *British Medical Journal* **5291** 1507–1513.
- Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G & Vettor R 2002 Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obesity Research* **10** 1095–1103.
- Moore GBT, Chapman H, Holder JC, Lister CA, Piercy V, Smith SA & Clapham JC 2001 Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286** 735–741.
- Morash BA, Ur E, Wiesner G, Roy J & Wilkinson M 2004 Pituitary resistin gene expression: effects of age, gender and obesity. *Neuroendocrinology* **79** 149–156.
- Puerta M, Abelenda M, Rocha M & Trayhurn P 2002 Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissues. *Hormone and Metabolic Research* **34** 629–634.
- Rajala MW, Obici S, Scherer PE & Rossetti L 2003 Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *Journal of Clinical Investigation* **111** 225–230.
- Rocha M, Bing C, Williams G & Puerta M 2003 Pregnancy-induced hyperphagia is associated with increased gene expression of hypothalamic agouti-related peptide in rats. *Regulatory Peptides* **114** 159–165.
- Ryan EA 2003 Hormones and insulin resistance during pregnancy. *Lancet* **362** 1777–1778.
- Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H *et al.* 2002 Role of leptin in pregnancy – a review. *Placenta* **23** (Suppl A) S80–S86.
- Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Abe M *et al.* 2002 Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes* **51** 1737–1744.

Resultados y Discusión

- Steppan CM & Lazar MA 2002 Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **13** 18–23.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409** 307–312.
- Trayhurn P & Beattie JH 2001 Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society* **60** 329–339.
- Trayhurn P, Duncan JS, Nestor A, Thomas MEA & Rayner DV 1994 Chemiluminescent detection of mRNAs on northern blots with digoxigenin end-labelled oligonucleotides. *Analytical Biochemistry* **222** 224–230.
- Trayhurn P, Duncan JS & Rayner DV 1995 Acute cold-induced suppression of *ob* (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochemical Journal* **311** 729–733.
- Way JM, Görgüç CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WO Jr, Willson TM, Klier SA & Hotamisligil GS 2001 Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor α agonists. *Journal of Biological Chemistry* **276** 25651–25653.
- Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Korita D, Takemura M & Fujii S 2003 Resistin is expressed in the human placenta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88** 1394–1397.

Received in final form 21 February 2005

Accepted 25 February 2005

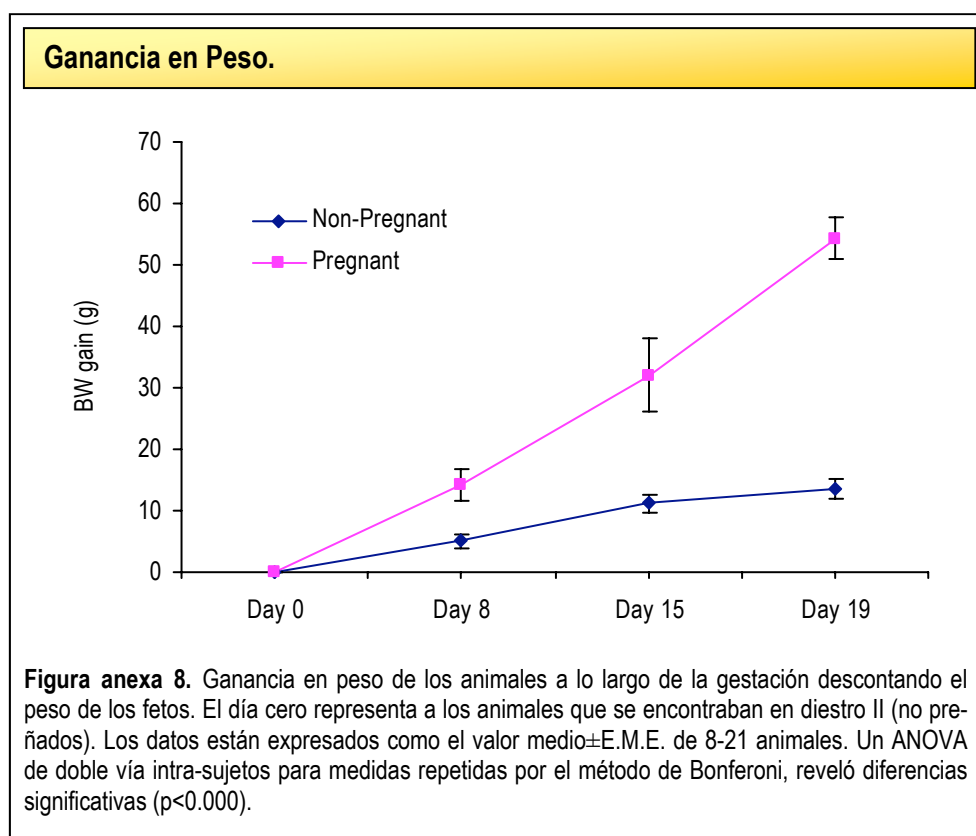
Made available online as an

Accepted Preprint 2 March 2005

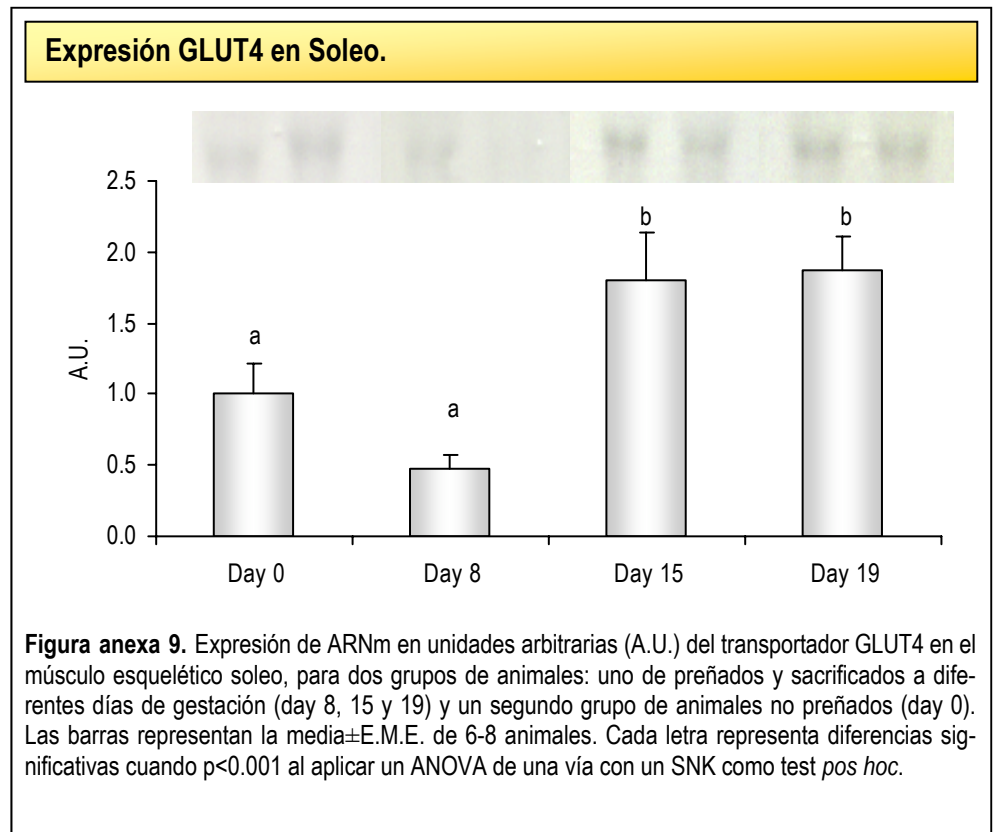
Resultados y Discusión

Otros resultados complementarios al artículo 2.

A continuación, se muestran algunos otros resultados no incluidos en lo publicado. La figura anexa 8 muestra la ganancia en peso de los animales a lo largo de la gestación, descontando el peso de los fetos. Así, se observaron incrementos significativos del peso de los animales desde el comienzo de la gestación, en comparación con el grupo de no gestantes. Por otro lado, la figura anexa 9 muestra la expresión de los receptores GLUT 4 existentes en el músculo *soleus* a diferentes días durante la gestación, donde se observó un aumento en la expresión del receptor hacia el final de la misma.



Resultados y Discusión



Resultados y Discusión

3. Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

Artículo en proceso de publicación

La resistina es una adipocina producida en la WAT, que está implicada en el desarrollo de la diabetes tipo II. La gestación ofrece un modelo para el estudio de los niveles de resistina y su variación, ya que se da una modulación de la resistencia a la insulina. Así, al comienzo de la gestación no varía la concentración en plasma de la proteína para aumentar en el último trimestre. Estos hechos, ocurren en ratas adultas pero en las crías a los primeros días de vida, se desconoce como varían la expresión y las concentraciones en el suero de la proteína. Por tanto, el objetivo del presente trabajo, consiste en determinar en qué momento comienza a expresarse la hormona en las crías así como sus variaciones sexuales. Para ello se utilizaron crías que fueron sacrificadas a día 5, 22 y 29 tras el parto. A su vez se obtuvieron muestras de sangre de las madres, antes y después del parto. Tras el destete (día 22) se observó un aumento en la expresión de resistina en la grasa parda de las crías, en comparación con la encontrada a día 5. Mientras que en la sangre disminuyó la concentración de la proteína en paralelo al aumento de expresión. A día 5 tras el parto, la grasa parda produjo 33 veces más resistina que el hígado. No se observaron diferencias significativas en cuanto a los sexos en las crías a los días 5, 22 y 29 tras el nacimiento. Las madres, presentaron un aumento en la concentración en el suero de resistina que cayó tras el destete. Podemos concluir, que la resistina aparece en estadios iniciales del desarrollo y que modula su propia expresión de acuerdo a sus niveles plasmáticos. Las madres al final de la gestación y durante la lactación, mantienen elevados niveles de dicha hormona lo que probablemente sirva como señal para las crías, de tal manera que podrían tener una adecuada ho-

Resultados y Discusión

meostasis de la glucosa. A su vez, no existen diferencias entre los sexos en cuanto a concentración plasmática y expresión de resistina, hecho que apunta a una posible regulación por parte de las hormonas sexuales de dicha molécula.

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

Caja S, Puerta M.

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II). Universidad Complutense de Madrid.

Resumen

La **resistina** es una adipocina producida en la WAT, que está implicada en el desarrollo de la diabetes tipo II. La gestación ofrece un modelo para el estudio de los niveles resistina y su variación, ya que se da una modulación de la resistencia a la insulina. Así, al comienzo de la gestación no varía la concentración en plasma de la proteína para aumentar en el último trimestre. Estos hechos, ocurren en ratas adultas pero en las crías a los primeros días de vida, se desconocen como varían los niveles de la proteína. Por tanto, el objetivo del presente trabajo, consiste en determinar en qué momento comienza a expresarse la hormona en las crías así como las variaciones sexuales. Para ello se utilizaron crías, procedentes de hembras preñadas, que fueron sacrificadas a día 5, 22 y 29 tras el parto. A su vez se obtuvieron muestras de sangre de las madres, antes y después del parto. Tras el destete (día 22) se observa un aumento en la expresión de resistina en la grasa parda de las crías, en comparación con los niveles a día 5. Mientras que en el suero existe una disminución de la concentración de la proteína paralela al aumento de expresión. A día 5 tras el parto, la grasa parda produce 33 veces más resistina que el hígado. No se observan diferencias significativas en cuanto a los sexos en las crías a los días 5, 22 y 29 tras el parto. Las madres, presentan un aumento en la concentración en el plasma de resistina que cae tras el destete. Se concluye que la resistina aparece en estadios iniciales del desarrollo y que modula su propia expresión de acuerdo a sus niveles plasmáticos. Las madres al final de la gestación y durante la lactación, mantienen elevados niveles de dicha hormona lo que probablemente sirve como señal para las crías, de tal manera que puedan tener una adecuada homeostasis de la glucosa. A su vez, no existen diferencias entre los sexos en cuanto a concentración plasmática y expresión de resistina, hecho que apunta a una posible regulación por parte de las hormonas sexuales de dicha molécula.

Introducción

El tejido adiposo es una fábrica de una gran variedad de péptidos bioactivos implicados en una amplia gama de procesos. Estas hormonas, se denominan adipocinas y sus funciones, así como su biología, están siendo ampliamente estudiadas y debatidas (Kusminski *et al.*, 2005). Entre ellas, encontramos la leptina, adiponectina, IL-6, TNF- α y la resistina que será el objeto de nuestro estudio y la recientemente descrita omentina (Schaffler *et al.*, 2005b, Yang *et al.*, 2006). Así pues, haremos un breve recorrido histórico desde su descubrimiento, pasando por su estructura molecular y localización, para llegar a sus funciones y posibles relaciones con ciertas enfermedades como la diabetes tipo II o diabetes del adulto, muy relacionada con la obesidad. La resistina es un péptido de 12,5 kDa, rico en cisteína y que pertenece a una familia de proteínas denominadas “resistin-li-

ke” (RELMs) (Steppan *et al.*, 2001b). Originalmente, fue descrita por tres grupos independientes de investigadores que trabajaban en áreas bien diferenciadas (Holcomb *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2001, Steppan *et al.*, 2001a). Los estudios iniciales, mostraron una regulación a la alta de los niveles de resistina en modelos animales de roedores con obesidad y resistencia a la insulina. Por otro lado, al tratar los animales con sensibilizadores de la acción de la insulina, como la Rosiglitazona (RSG), se observaba una regulación a la baja (Steppan *et al.*, 2001a). A su vez, cuando se inmunoneutralizaban los niveles de resistina en la sangre, se veía una mejora de la hiperglucemia y de la sensibilidad a la insulina (Steppan *et al.*, 2001a). Estas primeras observaciones causaron una gran expectación, ya que la resistina parecía ser la potencial causa de la etiología de una de las enfermedades de mayor prevalencia en el mundo, esto es, la diabetes tipo II. Actualmente, sus ac-

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

ciones, así como sus mecanismos de actuación e incluso sus relaciones con la obesidad y la diabetes tipo II están siendo profundamente debatidas, debido a que desde su descubrimiento se han encontrado hallazgos muy contradictorios.

El gen que codifica para la síntesis de resistina se ha denominado *Retn* que da lugar a la síntesis de un polipéptido de 114 aminoácidos (Steppan *et al.*, 2001a), y que configurará un homodímero unido mediante puentes di-sulfuro (Banerjee & Lazar, 2001). Gracias a los estudios de difracción de rayos X, se puede decir que su conformación espacial se corresponde con un hexámero (Patel *et al.*, 2004).

En roedores, la expresión de resistina se encuentra predominantemente localizada en el tejido adiposo blanco (Caja *et al.*, 2005, Steppan *et al.*, 2001a), existiendo una expresión diferencial de resistina según el depósito de grasa blanca del que hablemos. Así, los depósitos viscerales dan lugar a una mayor expresión que los subcutáneos (Borst *et al.*, 2005, Caja *et al.*, 2005). Por otro lado, otros grupos de investigación han encontrado expresión en la grasa parda (Oliver *et al.*, 2003), el músculo (Palanivel *et al.*, 2006) el tracto digestivo, el hígado, los riñones, el corazón (Nogueiras *et al.*, 2003), la placenta (Caja *et al.*, 2005), los pulmones (Holcomb *et al.*, 2000, Nohira *et al.*, 2004) e incluso en el hipotálamo (Wilkinson *et al.*, 2005). A su vez, se han encontrado diferencias sexuales en los niveles plasmáticos de resistina así como su expresión en el tejido adiposo (Gui *et al.*, 2004).

En humanos, algunos estudios determinan cierta expresión de resistina por parte de los adipocitos (Baker *et al.*, 2006, McTernan *et al.*, 2002), mientras que otros no la han encontrado (Fain *et al.*, 2003), aunque si se han encontrado altos niveles de expresión en la médula ósea (Patel *et al.*, 2003) así como en células del sistema inmunológico (Curat *et al.*, 2006, Jung *et al.*, 2006). También otros tejidos como la placenta (Lappas *et al.*, 2005), los pulmones (Patel *et al.*, 2003) y las células pancreáticas (Minn *et al.*, 2003) pueden expresar resistina.

Según lo ya comentado, los estudios iniciales mostraban que la resistina podía ser la proteína causante de la resistencia a la insulina y, por tanto, del desarrollo de la diabetes tipo II. En sangre de ratones obesos *ob/ob*, *db/db* e incluso en modelos donde se inducía obesidad mediante la dieta (DIO), fueron encontrados altos niveles de dicha molécula (Steppan *et al.*, 2001a). Así mismo, otros estudios encontraron que en una variedad de modelos animales la expresión y la secreción estaban disminuidas (Juan *et al.*, 2001, Rajala *et al.*, 2004). Así pues, se sugirió una posible relación con la enfermedad aunque habría otros factores implicados, que a su vez podrían regular dicha molécula. Por tanto, el mayor peso en el desarrollo de la diabetes tipo II no residiría en esta molécula sino en otras (Kusminski *et al.*, 2005).

La gestación es un buen modelo de estudio de la variación de la resistencia y sensibilidad a la insulina. Durante este proceso, se da una variación en el comportamiento metabólico de la rata. Esta variación conlleva aumentos de la expresión de resistina para posteriormente descender a los niveles basales (Caja *et al.*, 2005). Estudios de nuestro grupo de investigación ponen de manifiesto una relación entre la expresión de resistina con los niveles de esteroides sexuales femeninos. La producción de resistina así como su fisiología en crías de rata ha sido apenas estudiada. Así, no se tienen datos anteriores al destete comenzado los estudios a la tercera semana de vida (Gui *et al.*, 2004, Oliver *et al.*, 2003).

Basándonos en las observaciones en las madres durante la gestación y la poca información existente en cuanto a las crías así como las funciones atribuidas a esta proteína, nos planteamos los siguientes objetivos: Determinar los niveles de resistina en crías tras el parto para determinar en que momento de la vida extrauterina empieza a expresarse la hormona. Realizar un estudio de la variación de los niveles plasmáticos en las madres para si cabe establecer una relación con las crías antes y después del destete. Estudiar la variación de los mismos según el sexo de las crías.

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

Material y Métodos

Material Biológico.

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) hembras vírgenes de la cepa Wistar, de 200 gramos de peso corporal. Los animales fueron albergados en una cámara termostaticada a 22°C, en jaulas individuales, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (las luces eran encendidas a las 8 a.m.). A su vez, se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*, utilizando un pienso comercial (Pamlab, Barcelona, España) cuya composición era: 15,4% proteína; 2,9% materia grasa; 4,1% celulosa; 5,3% ceniza.

En todo momento el cuidado, manejo y utilización de los animales de experimentación, se acogió a lo dispuesto en el Real Decreto 223/1988 (BOE núm.67), así como en los principios de la Unión Europea (86/609 EEC).

Diseño Experimental.

Para su aclimatación a las nuevas condiciones ambientales, los animales a su llegada al laboratorio, permanecieron en la cámara termostaticada durante una semana. Transcurrido ese tiempo, fueron pesados y se determinó el momento del ciclo estral donde se encontraban. Así, con la ayuda de una torunda de algodón se tomaron muestras del exudado vaginal. Por la acción del colorante azul de metileno se visualizaron las células y por tanto se pudo diferenciar entre: proestro, estro, diestro I y diestro II. Las hembras que se encontraban en estro fueron introducidas en una jaula con un macho durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, se comprobó la cópula visualizando los espermatozoides en el exudado vaginal. El día del apareamiento se consideró como día cero de la gestación.

Tras 21 días de gestación las hembras dieron a luz sus crías. Transcurridas 24 horas después del alumbramiento las camadas fueron igualadas a 8 crías por camada. Por fin, 21 días después del parto se realizó el destete y las crías fueron separadas de la madre.

Obtención de Muestras.

En los días 5, 22 y 29 tras el parto (*post partum*, pp), 8 crías de ambos sexos (total 16 crías por día) fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se extrajeron muestras del tejido adiposo pardo (BAT) que rápidamente fueron congeladas a -80°C. A las crías que fueron sacrificadas el día 5pp se les extrajeron, también, muestras de hígado.

A su vez, tras la decapitación se obtuvieron muestras de sangre. Para obtener el suero, la sangre fue centrifugada a 5000 r.p.m. durante 20 minutos y 4 °C posteriormente se almacenó a -80 °C.

Del grupo de madres se obtuvieron muestras de sangre de la yugular en los días 5, 22 y 29pp. Para ello el animal fue ligeramente anestesiado con halothano. A partir de la sangre se obtuvo el suero según se ha indicado anteriormente.

Estudios de expresión génica mediante Northern Blott.

El primer paso en la determinación del ARN mensajero fue la extracción del ARN total mediante el método de *un solo paso* derivado del descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Para ello, se homogeneizaron los depósitos de BAT y las muestras de hígado (entre 300-500 mg) en 1ml de Ultraspec â (Biotex Laboratories Inc., USA) o reactivo de extracción, a 13.500 r.p.m. en un homogeneizador mecánico (Ultra-turrax T25).

Los procedimientos de fraccionamiento, transferencia a membrana e hibridación con una sonda de mRNA así como la detección de dicha sonda mediante quimioluminiscencia siguieron los protocolos descritos por Trayhurn (Trayhurn *et al.*, 1994). El RNA fue fraccionado y separado mediante una electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente fue transferido por capilaridad, a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche, Mannheim, Alemania). Para fijar los RNAs a la membrana, ésta se sometió a radiación ultravioleta. La detección del RNA de resistina se realizó utilizando un oligonucleótido antisentido marcado en 5' con digoxigenina (Oswell, Southampton,

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

Hampshire, UK). La secuencia de dicho oligonucleótido fue: 5'DIG-CGG ACG TCC CAT GAG CCA CAG CCA GAG CCA (Oswell, UK). Las membranas fueron incubadas con el oligonucleótido de resistina y posteriormente con FAB/ fosfatasa alcalina conjugada con anti-digoxigenina (Roche). Como sustrato quimioluminiscente fue usado *CDP-star* (Roche), para exponer posteriormente la membrana a una película fotográfica (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK). A su vez, la membrana fue hibridada con el 18S que es la subunidad pequeña del ribosoma y que se utilizó como control interno de la expresión ya que no se ve afectado por factores externos, según protocolo descrito por Trayhurn (Trayhurn *et al.*, 1995).

Medida de Resistina en el Suero.

La concentración de resistina en el suero de los animales fue medida utilizando un (ELISA) desarrollado por Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Belmont, CA, USA). Este ELISA es específico de humanos, aunque produce una reactividad cruzada con rata. Para determinar si este hecho era cierto, se realizó un test de paralelismo, cuyos resultados coincidieron con los datos anteriormente publicados (Chen & Nyomba, 2003) y lo determinado por Phoenix Pharmaceuticals, Inc.

Análisis estadísticos.

El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS, versión 10. Todos los datos se expresan como media \pm el error estándar de un número de entre 4 a 12 animales.

Para determinar la existencia de diferencias significativas se aplicaron diferentes test estadísticos teniendo en cuenta el valor de n ó número de resultados obtenidos y los grupos a comparar. Se aplicó un ANOVA de una vía y si se procedía, un Student Newman Keuls (SNK) como post hoc para determinar las diferencias entre:

Expresión de resistina en crías en BAT.

Diferencias de expresión y concentración en sangre entre sexos.

Concentración de resistina en el suero de las madres durante la gestación.

Un test Kruskal-wallis se aplicó para determinar las diferencias en la concentración de resistina en el suero de las crías. La prueba t de Student sirvió para la determinación de diferencias significativas en la expresión de resistina en BAT e hígado en las crías. Para determinar las variaciones en la concentración plasmática de resistina en las madres durante la lactancia, se aplicó un ANOVA intra-sujetos. Por último para estudiar la existencia de una relación lineal entre concentración de resistina en suero y expresión en BAT en las crías, se aplicó una correlación de Pearson. Se establecieron diferencias significativas cuando los valores de $p < 0,05$. A su vez, estas diferencias fueron resaltadas mediante letras.

Resultados

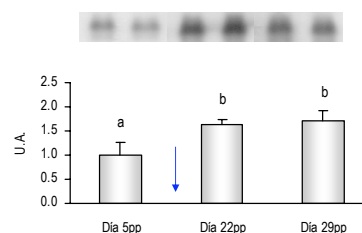


Figura 1. Expresión de resistina en la grasa parda de crías a diferentes días tras el parto (pp). La cantidad de mRNA de resistina se representa en unidades arbitrarias (U.A.). A su vez junto con la gráfica se ha introducido la banda que se corresponde a la resistina detectada mediante Northern Blott. Una flecha azul indica el momento del destete. Las barras representan la media \pm E.M.E. de 5-12 animales. Las diferentes letras revelan diferencias estadísticas entre los grupos, cuando se aplica un ANOVA de una vía y un SNK como test *post hoc*.

La expresión de resistina fue medida en la BAT de las crías a los días 5, 22 y 29pp. Se observó un aumento de la expresión de 0,5 veces a día 22 pp que se mantuvo en el día 29pp (figura 1). Al analizar los niveles de resistina en la sangre de las crías se observó un efecto inverso, (figura 2). Así,

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

en el día 22pp (24 horas después del destete) se produjo una disminución de la concentración de la proteína que pasó de $12,5 \pm 2,1$ (día 5pp) a $9,3 \pm 0,4$ y que se mantuvo en $9,4 \pm 0,6$ (día 29pp). A su vez, se encontraron diferencias significativas cuando se analizaron los datos mediante un test de Kruskal-Wallis.

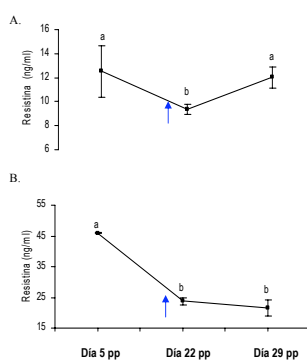


Figura 2. Panel A: Concentración (ng/ml) de resistina en el suero de recién nacidos a diferentes días tras el parto. Una flecha azul representa el momento del destete. Cada punto representa el valor de la media \pm E.M.E. de 5-12 animales. Las diferentes letras expresan valores de $p < 0,05$ entre los grupos cuando se aplica un test de Kruskal-Wallis.

Panel B: Concentración (ng/ml) de resistina en el suero de hembras a diferentes días tras el parto antes y después del destete (representado por una flecha azul). Cada punto representa el valor de la media \pm E.M.E. de 4 animales. Las diferentes letras expresan valores de $p < 0,000$ entre grupos cuando son analizados por un ANOVA de una vía intra-sujetos.

La figura 3 muestra una relación lineal inversa entre la concentración de resistina en sangre y su expresión en BAT. Al aplicar un test de correlación de Pearson se obtuvo un $r = -0,46$ cuando $n = 21$ y con un $p < 0,05$. Al medir la expresión diferencial de resistina entre BAT e hígado durante el día 5pp (figura 4) se observó una producción de 33 veces por debajo de la que se origina en BAT. Cuando se comparan las diferencias de expresión entre machos y hembras, no se observa ninguna diferencia significativa (resultado no mostrado). Por otro lado la tabla 1 muestra las diferencias en la concentración en sangre según el sexo. Nueva-

mente no se vuelven a encontrar diferencias entre los sexos.

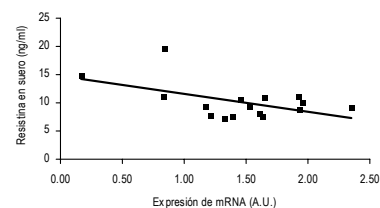


Figura 3. Relación lineal entre la concentración de resistina en suero y la expresión de resistina en la grasa parda. Para determinar la relación estadística se realizó una correlación de Pearson siendo el resultado $r = -0,46$; $n = 21$; $p < 0,05$.

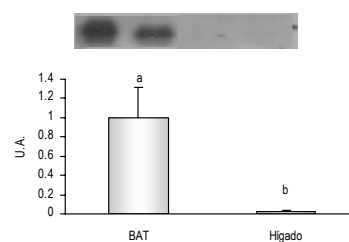


Figura 4. Comparación de la expresión de resistina en grasa parda (BAT) e hígado. La cantidad de mRNA se representa en unidades arbitrarias (U.A.). A su vez, junto con la gráfica se introdujeron las bandas correspondientes a los niveles de resistina detectados mediante Northern Blott. Las barras representan la media \pm E.M.E. de 5-12 animales. Las diferentes letras expresan diferencias significativas entre los grupos al aplicar una prueba t de Student.

En las madres, se da un aumento y disminución de los niveles de resistina en la sangre durante la gestación y la lactancia (tabla 2 y figura 2). Al final de la gestación aumenta la concentración de resistina (tabla 2) y se mantiene elevada durante la lactancia (figura 2) hasta el día 22pp (24 horas después del destete) donde cae a niveles próximos a los que tenía a día 0 de gestación (tabla 2).

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

Tabla 1. Concentración (ng/ml) de resistina en el suero de recién nacidos cuando se comparan machos con hembras. Los días en los que se extrajo sangre fueron los días 5, 22 y 29 tras el parto (pp).

	Machos	Hembras
Día 5 pp	12.5 ± 2.1	
Día 22 pp	9.4 ± 0.6	9.3 ± 0.6
Día 29 pp	12.1 ± 1.0	11.8 ± 2.0

Los datos se expresan como la media ± E.M.E. de 6-8 animales. No se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos al realizarse un ANOVA de una vía.

Tabla 2. Concentración de resistina en el suero (ng/ml) de madres durante la gestación.

Día 0	29.5 ± 1.3 ^a
Día 8	23.6 ± 2.5 ^b
Día 15	40.0 ± 1.0 ^c
Día 19	37.3 ± 2.1 ^c

Los valores se expresan como la media ± E.M.E. de 6-8 animales. Las diferentes letras indican valores de $p < 0.05$ cuando se analizan mediante un ANOVA de una vía usando un SNK como test post hoc.

Discusión

Varios eran los objetivos del presente trabajo. En primer lugar, estudiar los niveles de resistina en las crías tras el nacimiento ya que no habían sido descritos anteriormente. En segundo lugar, determinar los niveles de resistina en madres durante la lactancia y tras el destete. Por último, determinar la existencia de variaciones sexuales en la expresión y los niveles plasmáticos de resistina en las crías.

Atendiendo a lo planteado en el primer objetivo, observamos que las crías expresaban resistina al menos en dos tejidos, estos son, la BAT y el hígado. Este hecho coincide con los datos ya publicados para adultos y ratas jóvenes que también expresan la resistina en ambos tejidos (Nogueiras *et al.*, 2003, Oliver *et al.*, 2003). Se sabe que en el periodo perinatal, una perfecta regulación de la glucemia es crucial para el buen mantenimiento del equilibrio energético durante la vida adulta (Garg *et al.*, 2006, Moura *et al.*, 2002). Puesto que

la resistina se cree implicada en el metabolismo de la glucosa (Kusminski *et al.*, 2005) no parece extraña, su existencia en edades tan tempranas como las analizadas en el presente estudio. Esto es, nuestro trabajo demuestra que la resistina se expresa y, probablemente se necesita, desde los primeros días de vida extrauterina.

Aunque la expresión de resistina se observa ya en el día 5 pp, dicha expresión está aumentada a día 22 manteniéndose elevada en el día 29 pp. Sin embargo, la concentración plasmática muestra un perfil de variaciones distinto, de tal manera que el incremento de expresión entre los días 5 y 22pp corre paralelo a una disminución en la concentración plasmática. De hecho, existe una correlación inversa entre expresión y concentración plasmática (figura 3). Mas tarde, a día 29 pp la expresión se mantuvo y, sin embargo, la concentración plasmática recuperó sus valores iniciales (día 5 pp). Puesto que la expresión de resistina en las crías aumenta tras el destete y su concentración en plasma también resulta aumentada unos días mas tarde (día 29 pp); entendemos que dicho incremento plasmático procede del aumento concomitante de la expresión de las crías. En otras palabras, los bajos niveles de resistina son probablemente detectados por los adipocitos y estos a su vez responden aumentando la producción de una hormona, la resistina, necesaria para el organismo.

Esta explicación deja, sin embargo, inexplicados los resultados observados a día 5 pp en los cuales, la concentración plasmática es tan elevada como la observada a día 29, cuando la expresión en la BAT lleva varios días elevada. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que los niveles plasmáticos a los 5 días de vida en las crías, no procedan de la BAT, sino (a) de otras fuentes existentes en la propia cría, (ya que la resistina no se expresa exclusivamente en tejido graso) o (b) procedan de la madre, ya que hasta donde sabemos no existen datos que indiquen que la resistina no cruza la barrera materno-fetal. Para ensayar la primera posibilidad, analizamos la expresión hepática de resistina en las crías, ya que el hígado es uno de los órganos

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

que expresa resistina con mayor intensidad excluido el tejido adiposo (Nogueiras *et al.*, 2003). Nuestros resultados descartaron dicha posibilidad ya que, como muestra la figura 4, la expresión hepática fue 33 veces menor que la de la BAT, lo que difícilmente puede explicar la concentración plasmática alcanzada en ese momento por las crías. Para ensayar la segunda posibilidad, medimos la concentración de resistina en las madres antes y después del parto e incluso después del destete (tabla 2 y figura 2 respectivamente). Mientras que el parto no tuvo influencia en la resistina plasmática materna, si observamos una caída muy pronunciada tras el destete; lo cual sugiere que la separación de las crías reduce la necesidad materna de resistina. Todo ello nos hace pensar que la elevada concentración de resistina plasmática en las crías detectada a día 5 pp es, probablemente, de origen materno. Esta interpretación se ve reforzada por el hecho de que las crías tienen cantidades insignificantes de grasa blanca (lo que, por cierto, nos forzó a trabajar con el otro depósito graso, bien desarrollado en las crías) y por la ya mencionada necesidad de una regulación muy precisa de la glucemia en la etapa perinatal (Garg *et al.*, 2006, Moura *et al.*, 2002). Este mismo hecho ha sido observado en recién nacidos donde también se observan concentraciones plasmáticas de resistina elevadas en las madres y que se mantienen en las crías tras el parto (Ng *et al.*, 2005). Puesto que al destete, los niveles de prolactina materna disminuyen drásticamente, nuestros resultados señalan a la prolactina como mensajero químico implicado en dicha caída. De hecho, en cultivos de adipocitos se ha encontrado una inhibición de la liberación de resistina al medio por parte de la prolactina (Schaffler *et al.*, 2005a).

Nuestro último objetivo consistía en analizar las posibles diferencias sexuales en los niveles de resistina tanto en la expresión como en la concentración plasmática de las crías. Gui *et al.* (2004), ponen de manifiesto la existencia de diferencias significativas en dichos niveles en ratones, donde las hembras poseen mayores concentraciones de

resistina en sangre así como una expresión más elevada que los machos, atribuyendo estas diferencias a los niveles de hormonas sexuales. Nogueiras *et al.* (2003), encuentra diferencias significativas en la expresión de resistina por parte de la BAT en rata Sprague-Dawley a los dos meses de vida. Por ello, nos planteamos lo que ocurriría en estadios iniciales tras el parto.

Cuando estudiábamos los niveles plasmáticos de resistina en crías (tabla 1), así como su expresión (resultado no mostrado), no observamos diferencias entre los sexos. Teniendo en cuenta a) que durante la pubertad en la rata empiezan a aumentar los niveles hormonales para fomentar los cambios necesarios que originaran el comportamiento sexual; esta etapa se corresponde con los dos meses de vida (Gui *et al.*, 2004, Henderson *et al.*, 2006, Wesson & McGinnis, 2006) y b) que los estudios de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto una relación entre los estadios sexuales y la concentración plasmática y expresión de resistina, podemos concluir a la luz de los datos presentados que la ausencia de diferencias sexuales en la concentración plasmática así como la expresión en la BAT de las crías pueden verse condicionadas por la falta de concentraciones suficientes de ciertas hormonas sexuales. Este hecho viene avalado por la existencia de diferencias de expresión en la BAT en ratas a los dos meses de vida o en la pubertad, mientras que las crías en los días muestreados en este estudio, no presentan dichas diferencias. Así pues, las diferencias sexuales en cuanto a los niveles de expresión así como concentración plasmática de la resistina aparecerían tras la pubertad donde los niveles de hormonas sexuales son diferentes en machos que en hembras y por tanto anterior a este proceso la resistina no varía entre sexos.

Concluimos que la resistina aparece en estadios iniciales del desarrollo y que modula su propia expresión de acuerdo a sus niveles plasmáticos. Las madres al final de la gestación y durante la lactación, mantienen elevados niveles de dicha hormona lo que probablemente sirve como señal para las crías, de tal manera que puedan tener una

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

adecuada homeostasis de la glucosa. A su vez, no existen diferencias entre los sexos en cuanto a concentración plasmática y expresión de resistina, hecho que apunta a una posible regulación por parte de las hormonas sexuales de dicha molécula.

Bibliografía

- Baker AR, Silva NF, Quinn DW, Harte AL, Pagano D, Bonser RS, Kumar S & McTernan PG** 2006 Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* **5** 1.
- Banerjee RR & Lazar MA** 2001 Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* **276** 25970-25973.
- Bing C, Gomez-Ambrosi J, Zabalegui N, Williams G & Trayhurn P** 2002 Resistin and RELM- α gene expression in white adipose tissue of lactating mice. *Biochem Biophys Res Commun* **296** 458-462.
- Borst SE, Conover CF & Bagby GJ** 2005 Association of resistin with visceral fat and muscle insulin resistance. *Cytokine* **32** 39-44.
- Caja S, Martinez I, Abelenda M & Puerta M** 2005 Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats. *J Endocrinol* **185** 551-559.
- Chen L & Nyomba BL** 2003 Glucose intolerance and resistin expression in rat offspring exposed to ethanol in utero: modulation by postnatal high-fat diet. *Endocrinology* **144** 500-508.
- Chomczynski P & Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** 156-159.
- Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R & Bouloumié A** 2006 Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* **49** 744-747.
- Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW & Lloyd Hiler M** 2003 Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **300** 674-678.
- Garg M, Thamotharan M, Rogers L, Bassilian S, Lee WN & Devaskar SU** 2006 Glucose metabolic adaptations in the intrauterine growth-restricted adult female rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290** E1218-1226.
- Gui Y, Silha JV & Murphy LJ** 2004 Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res* **12** 1481-1491.
- Henderson LP, Penatti CA, Jones BL, Yang P & Clark AS** 2006 Anabolic androgenic steroids and forebrain GABAergic transmission. *Neuroscience* **138** 793-799.
- Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ et al.** 2000 FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J* **19** 4046-4055.
- Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF & Ho LT** 2001 Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **289** 1328-1333.
- Jung HS, Park KH, Cho YM, Chung SS, Cho HJ, Cho SY, Kim SJ, Kim SY, Lee HK & Park KS** 2006 Resistin is secreted from macrophages in atherosclerosis and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **69** 76-85.
- Kim KH, Lee K, Moon YS & Sul HS** 2001 A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* **276** 11252-11256.
- Komatsu T, Itoh F, Mikawa S & Hodate K** 2003 Gene expression of resistin in adipose tissue and mammary gland of lactating and non-lactating cows. *J Endocrinol* **178** R1-5.
- Kusminski CM, McTernan PG & Kumar S** 2005 Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* **109** 243-256.
- Lappas M, Yee K, Permezel M & Rice GE** 2005 Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol* **186** 457-465.
- McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH & Kumar S** 2002 Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **87** 2407.

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

- Minn AH, Patterson NB, Pack S, Hoffmann SC, Gavrilova O, Vinson C, Harlan DM & Shalev A 2003 Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* **310** 641-645.
- Moura AS, Franco de Sa CC, Lopez da Costa C, Vicente LL, Guerreiro SM & Pinto AM 2002 Association between nutrition and gender during lactation influencing glucose homeostasis and blood pressure of the adult offspring. *Biol Neonate* **82** 263-270.
- Ng PC, Lee CH, Lam CW, Chan IH, Wong E & Fok TF 2005 Resistin in preterm and term newborns: relation to anthropometry, leptin, and insulin. *Pediatr Res* **58** 725-730.
- Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF & Dieguez C 2003 Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett* **548** 21-27.
- Nohira T, Nagao K, Kameyama K, Nakai H, Fukumine N, Okabe K, Kitano S & Hisatomi H 2004 Identification of an alternative splicing transcript for the resistin gene and distribution of its mRNA in human tissue. *Eur J Endocrinol* **151** 151-154.
- Oliver P, Pico C, Serra F & Palou A 2003 Resistin expression in different adipose tissue depots during rat development. *Mol Cell Biochem* **252** 397-400.
- Palanivel R, Maida A, Liu Y & Sweeney G 2006 Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetologia* **49** 183-190.
- Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH & Smith SA 2003 Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* **300** 472-476.
- Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE & Shapiro L 2004 Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* **304** 1154-1158.
- Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE & Ahima RS 2004 Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* **53** 1671-1679.
- Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ & Lazar MA 2005 Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* **25** 1569-1575.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001a The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409** 307-312.
- Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD et al. 2001b A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** 502-506.
- Trayhurn P, Duncan JS & Rayner DV 1995 Acute cold-induced suppression of *ob* (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* **311** 729-733.
- Trayhurn P, Duncan JS & Rayner DV 1995 Acute cold-induced suppression of *ob* (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* **311** 729-733.
- Wesson DW & McGinnis MY 2006 Stacking anabolic androgenic steroids (AAS) during puberty in rats: A neuroendocrine and behavioral assessment. *Pharmacol Biochem Behav* **83** 410-419.
- Wilkinson M, Wilkinson D, Wiesner G, Morash B & Ur E 2005 Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology* **81** 19-30.
- Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE & Ahima RS 2004 Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* **53** 1671-1679.
- Schaffler A, Binart N, Scholmerich J & Buchler C 2005a Hypothesis paper Brain talks with fat—evidence for a hypothalamic-pituitary-adipose axis? *Neuropeptides* **39** 363-367.
- Schaffler A, Neumeier M, Herfarth H, Furst A, Scholmerich J & Buchler C 2005b Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* **1732** 96-102.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001a The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409** 307-312.
- Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD et al. 2001b A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** 502-506.
- Trayhurn P, Duncan JS & Rayner DV 1995 Acute cold-induced suppression of *ob* (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* **311** 729-733.

Resultados y Discusión

Expresión y concentraciones plasmáticas de la resistina en ratas recién nacidas.

Trayhurn P, Duncan JS, Nestor A, Thomas MEA & Rayner DV 1994 Chemiluminescent detection of mRNAs on northern blots with digoxigenin end-labelled oligonucleotides. *Anal Biochem* **222** 224-230.

Wesson DW & McGinnis MY 2006 Stacking anabolic androgenic steroids (AAS) during puberty in rats: A neuroendocrine and behavioral assessment. *Pharmacol Biochem Behav* **83** 410-419.

Wilkinson M, Wilkinson D, Wiesner G, Morash B & Ur E 2005 Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology* **81** 19-30.

Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC & Gong DW 2006 Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290** E1253-1261.

Resultados y Discusión

4. Modulación de la resistina por parte de las hormonas implicadas en la reproducción.

Control by reproduction-related hormones of resistin expression and plasma concentration. Horm. Metab. Res. 2007; 39:1-6.

Aunque no simultáneamente, la expresión de resistina en el tejido adiposo blanco y su concentración en plasma aumentan en la rata durante la gestación. Para aclarar la implicación de las hormonas sexuales en ambos incrementos, se administró durante 3-5 días progesterona, estradiol o gonadotropina coriónica a ratas hembras en diestro II. La progesterona incrementó la expresión de resistina en el depósito retroperitoneal de la grasa blanca pero no tuvo efecto sobre los depósitos parametrial y subcutáneo. A su vez se observó un aumento en la concentración de resistina en el suero. El estradiol disminuyó la expresión de resistina en los depósitos parametrial e inguinal de la grasa blanca aunque no tuvo efecto sobre los depósitos retroperitoneales. Ésta no alteró la concentración de resistina en el suero. La gonadotropina coriónica humana incrementó la expresión de resistina pero no alteró su concentración en el suero. Estos resultados muestran que las influencias hormonales sobre la expresión de resistina son dependientes de cada depósito de grasa blanca y que pueden correr independientemente de los cambios en la concentración plasmática. Por otro lado, el efecto restrictivo local de la progesterona sobre la expresión de resistina en comparación con la de gonadotropina coriónica humana sugiere que no es la única hormona que aumenta la expresión de resistina al comienzo de la gestación. Sin embargo, podría aumentar la liberación de resistina al final de la gestación. El estradiol, puede estar implicado en la disminución de la expresión de resistina al final de la gestación. Por último, como la gonadotropina

Resultados y Discusión

coriónica humana actúa a través de los receptores de LH, nuestros resultados sugieren por tanto que éstos se encuentran presentes en la grasa blanca y que controlan la expresión de resistina.

Control by Reproduction-related Hormones of Resistin Expression and Plasma Concentration

Author **S. Caja, M. Puerta**

Affiliation Department of Animal Physiology II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University, Madrid, Spain

Key words

- Estradiol
- progesterone
- chorionic gonadotropin
- white adipose tissue

Abstract

Although not simultaneously, resistin expression in white adipose tissue (WAT) and resistin plasma concentration have been shown to increase in pregnant rats. To clarify the involvement of sex hormones in such increases, we administered for 3–5 days progesterone, estradiol, or human chorionic gonadotropin (hCG) to female rats in dioestrus II. Progesterone increased resistin expression retroperitoneal WAT but lacked effect in parametrial or subcutaneous depots. It also increased resistin plasma concentration. Estradiol decreased resistin expression in both parametrial and inguinal WAT but was without effect on retroperitoneal depots. It did not alter plasma resistin. Human hCG increased resistin

expression in all the visceral depots examined – parametrial, inguinal and retroperitoneal – but did not change plasma resistin. These results show that hormonal influences in resistin expression are depot-dependent and can run separately from changes in its plasma concentration. Besides, the locally restricted effect of progesterone in resistin expression compared with that of hCG suggests it is not the only hormone enhancing resistin expression in early pregnancy. However, it could enhance resistin release in late pregnancy. Estradiol could be involved in the decrease of resistin expression in late pregnancy. Finally, since hCG acts through LH receptors, our results suggest that they are present in WAT and that they control resistin expression.

Introduction

White adipocytes are an active secretory cell type that releases a vast array of adipokines. Resistin is one of the most controversial ones. Proposed initially as a suppressor of adipocyte differentiation [1] it was soon related with glucose metabolism and insulin resistance [2]. At present after five years of research, none of these roles is universally accepted due to discrepant results among different laboratories (reviewed in [3]). As adipocytes are both the main cellular type for storing energy and an active secretory cell, it is reasonable to presume for adipokines a role in energy balance. Because of the clinical and economical importance of the epidemic of obesity in Western countries and the associated insulin resistance, resistin research have been centered in differences between lean and obese rodents and humans [3, 4]. First approaches to resistin role in physiological situations associated with intense metabolic changes in energy metabolism, such as lactation

[5], exposure to cold [6], and cancer-related cachexia [7] were carried out by analyzing resistin expression in main white adipose tissue (WAT) depots. Since no changes were observed, it cast more doubt about a role in normal physiology. However, pregnancy has been shown recently to be a physiological situation where the intense changes in energy metabolism are correlated with the higher increase in resistin expression published so far. Moreover, substantial changes in plasma concentration were also recorded. Interestingly, the same study revealed that changes in resistin expression are not mirrored by changes in plasma concentration of the protein and vice versa [8]. Simultaneously, discrepancies in the changes of expression and plasma concentration were also found in obese rodents [9, 10] and in aging mice [11] raising a new issue in resistin control.

During pregnancy there are major changes in hormonal pattern. In the rat, the presence of the corpus luteum is required during the whole pregnancy which is the only source of progesterone, a

received 24. 10. 2006
accepted 22. 12. 2006

Bibliography
DOI 10.1055/s-2007-982515
Horm Metab Res 2007;
39: 1–6
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0018-5043

Correspondence
M. Puerta
Department of Animal
Physiology II
Faculty of Biological Sciences
Complutense University
José Antonio Novais 2
28047 Madrid
Spain
Tel.: + 34/91/394 49 90
Fax + 34/91/394 49 35
mpuerta@bio.ucm.es

Caja S, Puerta M. Hormonal Control of Resistin... Horm Metab Res 2007; 39: 1–6

hormone essential for maintaining pregnancy. Indeed, ovariectomy produces abortion [12]. Mechanical stimulation of vagina during mating triggers hypophysial prolactin surges that persist for the first 8–10 days of pregnancy. Later on, it is placental lactogen that maintains corpus luteum. On the contrary, in primates corpus luteum maintenance at the beginning of pregnancy is achieved by the release from the embryonic syncytiotrophoblasts of a chorionic gonadotropin (CG) structurally similar to pituitary LH [13–15]. Nonetheless, progesterone is not the only sex steroid that changes during pregnancy. In fact, plasma estradiol increases sharply at the end of pregnancy [16, 17].

It has been shown that human CG (hCG) is active in female rats where it increases either plasma progesterone [18] or plasma estradiol [19] depending on the duration of the treatment and on the stage of the estrus cycle. At the same time, we previously observed that a single dose of hCG given at dioestrus enhances resistin expression in parametrial WAT [8]. Thus, the first aim of this work was to check whether progesterone or estradiol could be responsible for the changes in resistin expression and plasma concentration observed during pregnancy. The second aim of this work was to analyze if hCG effects in resistin expression could be mediated by rising estradiol or progesterone plasma concentration.

Materials and Methods

Animals

Female Wistar rats weighing 200 g were housed at 22 °C in individual cages, with freely available water and food (A04, Panlab, Barcelona, Spain) and 12-hour light/12h darkness cycle. Three groups of animals were considered according to the hormonal treatment they received. Progesterone treated rats were implanted with two progesterone-filled Silastic capsules, under halothane anesthesia; controls receiving empty capsules. Killing took place 5 days after capsules implantation. Estradiol treated rats received a daily s.c. injection of estradiol for three consecutive days; control received vehicle only. Killing took place 24 hours after giving the last injection. Gonadotropin treated rats received a daily injection of hCG during three consecutive days. They were killed 24 hours after receiving the last injection. Control animals received vehicle only. Injections, capsule implantation, and sacrifice took place between 10:00 and 12:00 AM. All treatments began in rats in diestrus II as judged by examination of vaginal smears. Rats were killed by decapitation. Animals were cared for and used in accordance with the principles of the Council of European Communities (86/609 EEC).

Hormonal Treatment

Silastic capsule (Dow Corning, MI, USA, 4 cm long; 3.18 mm o. d.; 1.57 mm i. d.) were filled with 25 mg progesterone each. We have previously observed a joined daily release of 0.15–0.2 mg [20]. Estradiol (Sigma, St Louis, MO, USA), was dissolved in 10 ml sesame oil containing less than 0.5% of ethanol at a concentration of 1 mg/ml. Every dose injected contained 0.2 mg of estradiol. hCG (Sigma, St Louis, MO, USA) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS). Every animal received a 140 μ l injection containing 2001 U.hCG.

Sample collection

Trunk blood was collected at the time of decapitation. It was centrifuged to obtain serum that was stored at –80 °C until anal-

ysis. Samples of parametrial, retroperitoneal, subcutaneous and inguinal WAT depots from left side of animals were quickly removed, frozen in liquid N₂ and stored at –80 °C until analysis of resistin expression.

mRNA detection

WAT samples were homogenized in Ultraspec reagent (Biotec Laboratories, Houston, TX, USA), to obtain total cellular RNA, based on the single-step method of Chomczynski and Sacchi [21]. The procedures used for the fractionation, blotting and hybridization of mRNAs together with a chemiluminescence detection protocol were carried out as described previously [22]. In outline, RNAs were fractionated by agarose electrophoresis gel, transferred to a positively charged nylon membrane (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) by capillary blotting and cross-linked under UV light. Resistin's mRNA was detected using a specific antisense oligonucleotide end-labeled 5' with digoxigenin (Oswell, Southampton, UK) as previously described [6]. The membranes were incubated sequentially with the oligonucleotide and with an anti-digoxigenin FAB/alkaline phosphatase conjugate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and then processed essentially as in the protocols provided by the manufacturer. CDP-star[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was used as the chemiluminescence substrate. Signals were obtained by X-ray film exposure of the membrane (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Membranes were stripped and reprobed for 18S rRNA to adjust for any differences in the loading and transfer of RNA during blotting. 18S rRNA was detected using a 31-mer antisense oligonucleotide probe, as previously described [23].

Serum Measures

Resistin concentration was measured with the human enzyme immunoassay kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA), which according to the manufacturer, recognizes rat resistin. Parallelism was tested and results agreed with both the manufacturer and previous reports using the kit in rats [8,24]. hCG, estradiol, and progesterone were assayed in serum of the respective treated groups using EIA kits (LDN, Nordhorn, Germany).

Statistical analysis

We first checked whether or not data followed a normal distribution so that we could choose the proper test for statistical comparison between groups. It was carried out using a Levene's test that calculates the homogeneity of the variance. If variance is homogeneous, $p > 0.05$ in Levene's test, it indicates a normal distribution of the data and Student *t*-test was used. On the contrary, when $p < 0.05$ in Levene's test, a Mann-Whitney test was used. A *p* Value of < 0.05 was considered as statistically significant in both cases.

Results

Progesterone treatment

Progesterone-filled implants increased plasma progesterone 9 times reaching values similar to those in pregnant rats in middle pregnancy [16] (Table 1). A 4 times increase in resistin expression was observed in retroperitoneal WAT of the treated rats (Fig. 1). However, the treatment lacked any effect in paramet-

Table 1 Hormone concentration in plasma of rats receiving progesterone, estradiol, or human chorionic gonadotropin for 3–5 days and in their respective control vehicle treated animals

Treatment	Controls	Treated rats
progesterone ng/ml	6.6 ± 4.0	54.6 ± 7.54 [*]
estradiol pg/ml	6.1 ± 1.3	33.2 ± 5.7 [*]
hCG mIU/ml	n. d.	636.3 ± 39.3

Data are expressed as mean values ± S.E.M. of 6–8 animals

^{*}indicates p < 0.05 when compared with the respective control by either a Student t-test (progesterone) or a Mann-Whitney test (estradiol)

Table 2 Plasma resistin (ng/ml) in rats receiving progesterone, estradiol, or human chorionic gonadotropin for 3–5 days and in their respective control vehicle treated animals

Treatment	Controls	Treated rats
progesterone	18.0 ± 1.4	24.3 ± 3.2 [*]
estradiol	31.7 ± 2.9	29.9 ± 3.3
hCG	30.8 ± 2.5	34.1 ± 0.1

Data are expressed as mean values ± S.E.M. of 6–8 animals

^{*}indicates p < 0.05 when compared with the respective control by either a Student t-test (estradiol) or a Mann-Whitney test (hCG and progesterone)

trial or subcutaneous WAT. At the same time, progesterone increased plasma resistin (Table 2).

Estradiol treatment

Daily estradiol administration was effective in increasing plasma concentration of the hormone (Table 1). The 3–5 times increase is similar to that published for pregnant rats. The presence of high plasma estradiol concentration produced a clear depressing effect (30%) in resistin expression in parametrial WAT, as shown in Fig. 2. Such effect was also observed in inguinal and retroperitoneal WAT, but it did not attain statistical significance. The reduction in resistin expression did not alter plasma resistin that was unchanged after estradiol treatment (Table 2).

Gonadotropin treatment

Table 1 shows the effectiveness of the hCG treatment. Indeed, hCG was undetected in control animals, but clearly measurable in treated rats. After three days of hCG administration, plasma progesterone was unaltered (data not shown) but plasma estradiol was significantly enhanced (3.4 ± 0.7 in controls versus 29.3 ± 3.6 in treated rats). Fig. 3 shows that resistin expression was enhanced in three different visceral WAT depots after hCG treatment. Such enhancement was 2–3 times in retroperitoneal WAT whereas it was 5–6 times in both parametrial and inguinal WAT. Nonetheless, plasma resistin was not altered by the presence of high plasma levels of hCG (Table 2).

Discussion

Data presented in this paper show that resistin expression is influenced by those hormones involved in reproduction, namely progesterone, estradiol, and chorionic gonadotropin. Their effects are, however, different in intensity and trend and are also site dependent. In fact, progesterone increases resistin expression but only in retroperitoneal WAT (Fig. 1). At the same time, it increases moderately plasma concentration of resistin (Table 2). Estradiol decreases resistin expression in parametrial

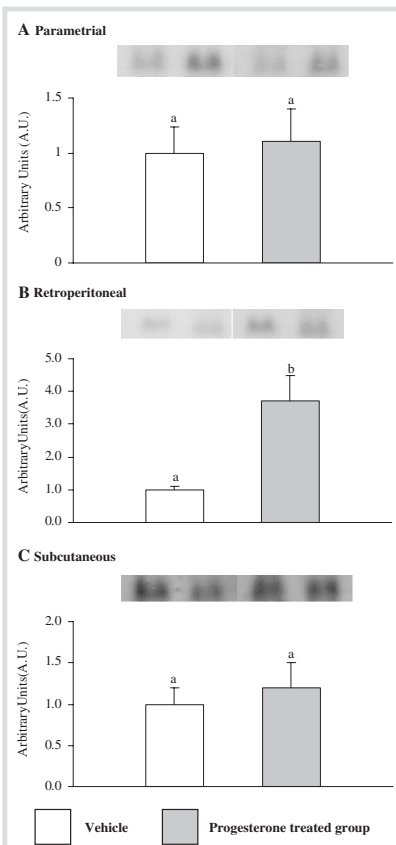
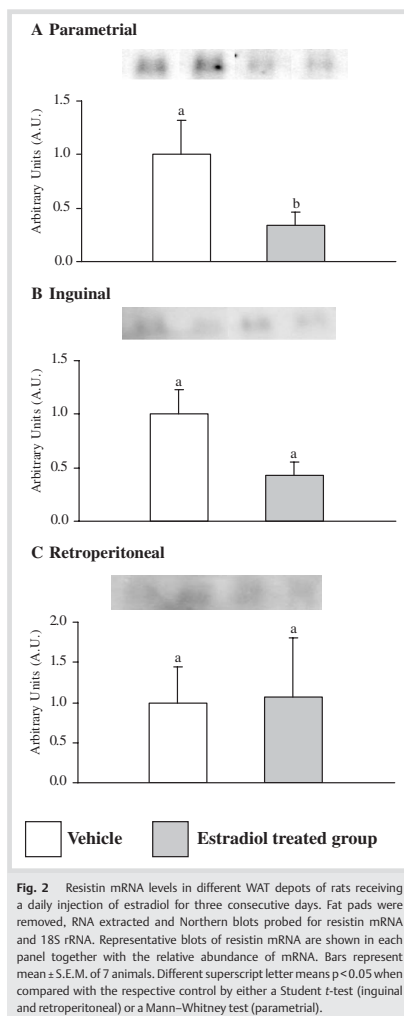


Fig. 1 Resistin mRNA levels in different WAT depots of rats receiving progesterone five days by means of subcutaneous implants. Fat pads were removed, RNA extracted and Northern blots probed for resistin mRNA and 18S rRNA. Representative blots of resistin mRNA are shown in each panel together with the relative abundance of mRNA. Bars represent mean ± S.E.M. of 6–8 animals. Different superscript letter means p < 0.05 when compared with the respective control by either a Student t-test (parametrial and subcutaneous) or a Mann-Whitney test (retroperitoneal).

and inguinal WAT depots (Fig. 2) – as previously shown in ovariectomized rats [25] and mice [11] – but no change in plasma resistin accompanied with that change (Table 2). hCG increases resistin expression in all the three of the WAT depots examined – parametrial, inguinal, and retroperitoneal – but again no change in plasma resistin took place simultaneously (Fig. 3, Table 2). These differential effects in expression and in plasma concentration demonstrate that hormones influence on WAT resistin can be carried out only at the level of expression but

Resultados y Discusión



without a concomitant change in plasma concentration and vice versa, as generally assumed. Moreover, they agree with results in pregnant rats [8], where increases in resistin expression and plasma concentration take place at different times, and in obese mice, where obesity developed by a high fat diet increases plasma resistin without changing its expression [9,10], and in aging female mice, where plasma levels decrease despite RNA levels are maintained [11].

Caja S, Puerta M. Hormonal Control of Resistin... Horm Metab Res 2007; 39: 1-6

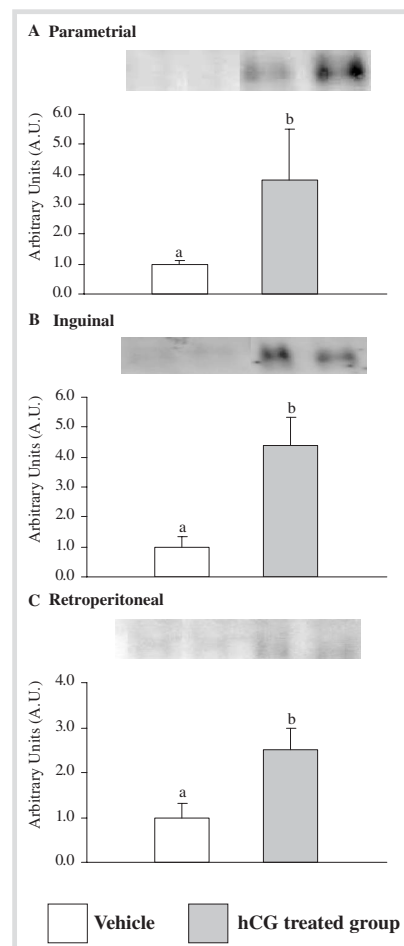


Fig. 3 Resistin mRNA levels in different WAT depots of rats receiving a daily injection of human chorionic gonadotropin for three consecutive days. Fat pads were removed, RNA extracted and Northern blots probed for resistin mRNA and 18S rRNA. Representative blots of resistin mRNA are shown in each panel together with the relative abundance of mRNA. Bars represent mean \pm S.E.M. of 6-7 animals. Different superscript letter means $p < 0.05$ when compared with the respective control by either a Student t-test (inguinal and retroperitoneal) or a Mann-Whitney test (parametrial).

Estradiol and progesterone effects depended on the WAT depot analyzed, progesterone being effective on retroperitoneal WAT but ineffective in parametrial depot whereas estradiol was effective

tive in parametrial and inguinal but not in retroperitoneal (© Figs. 1, 2). These results probably reflect the differential distribution of sex steroid receptors which are present in WAT depots in an unevenly distribution [26,27] suggesting that every WAT depot plays a specific role in resistin physiology. Our results could also explain some divergent results obtained in previous studies. Indeed, ovariectomy has been previously used as a tool to assess the effects of female sex steroids in resistin expression, rendering either no effect in rats [28] or an increase in mice and rats [11,25]. Two out of these three studies [11,28], however, analyzed only one depot. This fact indicates the importance of analyzing several depots before reaching definitive conclusions and gives support to the view that white adipose tissue cannot be viewed as a single physiological unit but as a collection of them. The discrepancies between the *in vivo* studies just mentioned and the *in vitro* one, that use of 3T3-L1 adipocytes has found a stimulatory influence of estradiol on resistin expression [29], remains to be explained.

CG is used by primates to maintain corpus luteum during the first half of pregnancy [13,14]. However, there is no specific receptor for this gonadotropin that acts through the LH receptor which is consequently known as LH/CGR [30,31]. We administered hCG at the end of the oestrus cycle when luteal cells are close to disappearance and new follicles are developing. We obtained a dual effect. On the one hand, plasma estradiol was enhanced in agreement with the stimulatory role of hCG on follicular steroidogenesis [19]. On the other hand, resistin expression was also enhanced despite the inhibitory role of estradiol on such parameter. Therefore, these divergent results suggest that hCG effects are not mediated to its effects on follicular steroidogenesis. Moreover, the stimulatory effects of hCG took place without any change in plasma progesterone thus implying that the effect of hCG had taken course without the participation of progesterone. This conclusion is reinforced by the increases obtained with hCG together with its broader distribution in WAT depots. Indeed, mutant mice with inactivated LH/CGR are not rendered normal with estradiol and progesterone administered jointly indicating a LH/CG signaling independent of gonadal steroids [32]. Certainly, the presence of LH/CGR is documented in a variety of nongonadal tissues [33], although, as long as we know, no studies have dealt with the presence of LH/CGR in WAT as suggested by the present study.

What could be the role of sex steroids on controlling resistin during pregnancy? The moderate stimulatory effect of progesterone and the inhibitory one of estradiol suggest that they are no major players in the dramatic increase in resistin expression in visceral WAT depots in early pregnancy. Later on, by the end of pregnancy, when progesterone falls and estradiol increases, the inhibitory role of estradiol and the reduction in the stimulatory one of progesterone suggest that they can be major players in controlling resistin expression. At the same time, progesterone, before its own decline, could contribute to the increase in plasma resistin that takes place in late pregnancy.

To our knowledge, hCG is the most potent hormonal signal in increasing resistin expression in WAT depots. This result can be extremely useful as a tool for analyzing the factors involved in controlling resistin gene expression. From a physiological point of view it is clear which signal is responsible for the dramatic increases in resistin expression in early pregnancy since, as already mentioned, rats lack CG. Nonetheless, since CG acts through LH/CGR, this study points out some involvement of LH in controlling resistin expression during oestrus cycle. Undoubt-

edly, other factors not considered in this study should be considered in future studies. Prolactin would be a good candidate since it not only increases in plasma in early pregnancy but also is known to suppress resistin release from adipocyte cultures [34].

To summarize, estradiol and progesterone increased and decreased resistin expression, respectively, but these effects were not present in all WAT depots suggesting specific effect in every one of them. hCG increased resistin expression in all the depots examined but such effect seemed to be independent of both estradiol or progesterone. It suggested the presence of LH/CGR in WAT. Only progesterone modified plasma resistin indicating that hormonal influences on WAT expression can be carried out without changes in plasma secretion.

Acknowledgments

▼ This work was supported by grant BFI2003-01414 from MCyT given to Marisa Puerta.

References

- Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2001; 276: 11252–11256
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307–312
- Kusminski CM, MacLernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 243–256
- Schäffler A, Büchler C, Müller-Ladner U, Herfarth H, Ehling A, Paul G, Schölmerich J, Zietz B. Identification of variables influencing resistin serum levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 2004; 36: 702–707
- Bing C, Gomez-Ambrosi J, Zabalegui N, Williams G, Trayhurn P. Resistin and RELM- α gene expression in white adipose tissue of lactating mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 458–462
- Puerta M, Abelenda M, Rocha M, Trayhurn P. Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissues. *Horm Metab Res* 2002; 34: 629–634
- Gomez-Ambrosi J, Zabalegui N, Bing C, Tisdale MJ, Trayhurn P, Williams G. Weight loss in tumour-bearing mice is not associated with changes in resistin gene expression in white adipose tissue. *Horm Metab Res* 2002; 34: 674–677
- Caja S, Martínez I, Abelenda M, Puerta M. Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats. *J Endocrinol* 2005; 185: 551–559
- Lee JH, Bullen JW, Jr, Stayneva VL, Mantzoros CS. Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E625–E632
- Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 2004; 53: 1671–1679
- Gui Y, Silha JV, Murphy LJ. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res* 2004; 12: 1481–1491
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, MacIntosh EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000; 80: 1–29
- Leymarie P, Martal J. Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif. Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif Thibault C, Levasseur M. Paris: INRA Editions, 2001
- Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle in the rat. The neuroendocrine control of the ovarian cycle in the rat Knobil E, Neill J. New York: Prentice Hall, 1994: 613–658
- Freemark M, Kirk K, Pihoker C, Robertson MC, Shiu RP, Driscoll P. Pregnancy lactogens in the rat conceptus and fetus: circulating levels, distribution of binding, and expression of receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 1993; 133: 1830–1842

Caja S, Puerta M. Hormonal Control of Resistin ... *Horm Metab Res* 2007; 39: 1–6

Resultados y Discusión

6 Original Clinical

HMR/348/8.6.2007/Macmillan

- 16 Lu C-C, Tsai S-C, Wang S-W, Tsai C-L, Lau C-P, Shih H-C, Chen Y-H, Chiao Y-C, Liaw C, Wang PS. Effects of ovarian steroid hormones and thyroxine on calcitonin secretion in pregnant rats. *Am J Physiol* 1998; 274: E246-E252
- 17 Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawabayashi T, Futagami K, Gomita Y. Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides* 2004; 25: 279-287
- 18 Chern BY, Chen YH, Hong LS, Lapolt JS. Ovarian steroidogenic responsiveness to exogenous gonadotropin stimulation in young and middle-aged female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 224: 285-291
- 19 Ghosh S, Misro M, Das UB, Maiti R, Debnath JM, Ghosh D. Effect of human chorionic gonadotropin coadministration on ovarian steroidogenic and folliculogenic activities in cyclophosphamide treated albino rats. *Reprod Toxicol* 2001; 15: 221-225
- 20 Rocha M, Bing C, Williams G, Puerta M. Physiologic estradiol levels enhance hypothalamic expression of the long form of the leptin receptor in intact rats. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 328-334
- 21 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159
- 22 Trayhurn P, Duncan JS, Nestor A, Thomas MEA, Rayner DV. Chemiluminescent detection of mRNAs on northern blots with digoxigenin end-labelled oligonucleotides. *Anal Biochem* 1994; 222: 224-230
- 23 Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV. Acute cold-induced suppression of *ob* (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* 1995; 311: 729-733
- 24 Chen L, Nyomba BL. Glucose intolerance and resistin expression in rat offspring exposed to ethanol in utero: modulation by postnatal high-fat diet. *Endocrinology* 2003; 144: 500-508
- 25 Huang SW, Seow KM, Ho LT, Chien Y, Chung DY, Chang CL, Lai YH, Hwang JL, Juan CC. Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 2005; 579: 449-454
- 26 Mayes JS, Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 2004; 5: 197-216
- 27 Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM, Roca P. Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E200-E207
- 28 Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res* 2003; 11: 408-414
- 29 Chen YH, Lee MJ, Chang HH, Hung PF, Kao YH. 17 beta-estradiol stimulates resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes via the estrogen receptor, extracellularly regulated kinase, and CCAAT/enhancer binding protein-alpha pathways. *Endocrinology* 2006; 147: 4496-4504
- 30 Costagliola S, Urizar E, Mendive F, Vassart G. Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors. *Reproduction* 2005; 130: 275-281
- 31 Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 2002; 23: 141-174
- 32 Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 184-200
- 33 Rao CV. Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertil Steril* 2001; 76: 1097-1100
- 34 Schaffler A, Binart N, Scholmerich J, Buchler C. Hypothesis paper Brain talks with fat-evidence for a hypothalamic-pituitary-adipose axis? *Neuropeptides* 2005; 39: 363-367

Caja S, Puerta M. Hormonal Control of Resistin... *Horm Metab Res* 2007; 39: 1-6

Resultados y Discusión

5. Síntesis y liberación de la IL-6 y del TNF- α en la WAT, sus concentraciones en el suero y en el líquido cefalorraquídeo.

White adipose tissue production and release of IL-6 and TNF- α do not parallel plasma and cerebrospinal fluid concentrations in pregnant rats. Manuscrito en fase de revisión.

La IL-6 y el TNF- α se sintetizan en el tejido adiposo blanco por los adipocitos y por la fracción del estroma vascular. Ambas interfieren en la señalización de la insulina reduciendo la sensibilidad a la insulina y el depósito de lípidos. A nivel central la IL-6 aumenta la actividad del sistema nervioso simpático como consecuencia aumentan la lipólisis y reduce la masa grasa. Al final de la gestación, la masa del tejido adiposo blanco incrementa y la sensibilidad a la insulina decrece. Para estimar la participación de las dos adipocinas en ambos procesos, se analizaron su contenido y liberación en la grasa parametrial y subcutánea y su concentración en suero y en líquido cefalorraquídeo de ratas no gestantes y gestantes a días 8, 15 y 19. El contenido de los tejidos de ambas adipocinas aumentó de 5-6 veces en el día 8 hasta el final de la gestación para el depósito parametrial, mientras que este incremento ocurrió en el día 15 para la grasa subcutánea. No se detectó liberación del tejido lo que sugiere una acción local. La concentración de IL-6 en suero se encontró aumentada a día 8 de gestación hasta el final de la misma, lo que sugiere otra fuente además de la grasa blanca. La concentración de IL-6 en el líquido cefalorraquídeo fue paralela a los aumentos en el suero en los días 8 y 15, lo que sugiere un origen sistémico. Sin embargo, disminuyó hasta alcanzar los niveles basales en el día 19 lo que sugiere una resistencia central. TNF- α no se detectó ni en el suero ni en el líquido cefalorraquídeo. Estos resultados nos llevan a concluir

Resultados y Discusión

que a lo largo de la gestación las adipocinas controlan el que se deposite grasa en el tejido adiposo blanco dependiendo del tiempo y del tipo de depósito. Ambas actúan directamente a nivel local e indirectamente por activación del gasto energético a nivel central.

Hormone and Metabolic Research

W. A. Scherbaum, University Hospital Duesseldorf, Moorenstrasse 5, 40225 Duesseldorf

Marisa Puerta, MD
Department of Animal Physiology II
Faculty of Biological Sciences
Complutense University
28040 Madrid
SPAIN

Werner A. Scherbaum, MD, PhD
Department of Endocrinology,
Diabetes and Rheumatology
University Hospital Duesseldorf
Moorenstrasse 5
40225 Duesseldorf (Germany)
Phone: +49 (211) 81-18 502
Fax: +49 (211) 81-18 772
E-mail: hmr@thieme.de

Editor-in-Chief:
Werner A. Scherbaum, Duesseldorf (Germany)

Assistant Editor:
Matthias Schott, Duesseldorf (Germany)

Associate Editors:
Hubert Vaudry, Mont-Saint-Aignan (France)
Derek LeRoith, New York (USA)
Stefan R. Bornstein, Dresden (Germany)

20 August 2007

Requesting revision of the manuscript 8042 by Caja & Puerta

Dear Doctor Puerta

Please find enclosed the comments of the reviewers. The authors are requested to revise the manuscript taking in all the points raised by the reviewers.

To facilitate re-evaluation of the revised manuscript, please respond to each criticism on a separate page and indicate precisely the changes that you have made in response to the critiques. In case you feel the criticisms unjustified, please give reasons why. In any case, identify any other changes you made and consider the editorial points as well.

With your revision, please provide 2 copies of the text and its final and complete set of figures, 2 glossy prints of any revised figures, and 2 copies of a letter detailing the modifications you have made. Please also provide an electronic version of your manuscript and if possible a separate one of your figures. Please note that figures with microscopic enlargements should contain scale and length measurements. Please find also enclosed some copies of articles on your topic already printed in **Hormone and Metabolic Research**. We would be very pleased if you included two or three of these in your list of references.

Your revised paper should be returned within **two months** of the date of this letter. Thank you.

Yours sincerely



Werner A. Scherbaum, MD
Editor-in-Chief
Encls.

Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14 · 70469 Stuttgart
Postfach 30 11 20 · 70451 Stuttgart



Hormone and Metabolic Research

W. A. Scherbaum, University Hospital Duesseldorf, Moorenstrasse 5, 40225 Duesseldorf

Marisa Puerta, MD
Department of Animal Physiology II
Faculty of Biological Sciences
Complutense University
28040 Madrid
SPAIN

Fax: 34 913944935

Werner A. Scherbaum, MD, PhD
Department of Endocrinology,
Diabetes and Rheumatology
University Hospital Duesseldorf
Moorenstrasse 5
40225 Duesseldorf (Germany)
Phone: +49 (211) 81-18 502
Fax: +49 (211) 81-18 772
E-mail: hmr@thieme.de

Editor-in-Chief:
Werner A. Scherbaum, Duesseldorf (Germany)

Assistant Editor:
Matthias Schoitt, Duesseldorf (Germany)

Associate Editors:
Hubert Vaudry, Mont-Saint-Aignan (France)
Derek LeRoith, New York (USA)
Stefan R. Bornstein, Dresden (Germany)

11 July 2007

MS 8042 by Caja & Puerta

Dear Doctor Puerta

We acknowledge receipt of your manuscript, entitled

White Adipose Tissue Production and Release of IL-6 and TNF- α do not Parallel Plasma and Cerebrospinal Fluid Concentrations in Pregnant Rats

Thank you for submitting it to **Hormone and Metabolic Research**. Your paper has been forwarded to the referees for evaluation. As soon as we get their reviews back you will hear from us immediately.

For all correspondence please **always** refer to your manuscript number.

Yours sincerely

Bjoern Cordes
Editorial Office

Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14 · 70469 Stuttgart
Postfach 30 11 30 · 70451 Stuttgart

Resultados y Discusión

White adipose tissue production and release of IL-6 and TNF- α do not parallel plasma and cerebrospinal fluid concentrations in pregnant rats

Sergio Caja and Marisa Puerta*

Department of Animal Physiology II

Faculty of Biological Sciences

Complutense University

28040 Madrid, Spain

Key words: parametrial fat, subcutaneous fat, adipokines, pregnancy

Short title: IL-6 and TNF- α in pregnant rats

*Correspondence author

mpuerta@bio.ucm.es

Fax number: 34 913944935

Resultados y Discusión

Abstract

IL-6 and TNF- α are synthesized in white adipose tissue both by adipocytes and by the stroma-vascular fraction. They both are known to interfere with insulin signalling reducing insulin sensitivity and lipid deposition. At a central level, Il-6 enhances sympathetic nervous system activity thus enhancing lipolysis and reducing fat mass. During late pregnancy, white adipose tissue mass increases and insulin sensitivity decreases. To assess the involvement of both adipokines in such processes we analyzed the tissue content and release of both adipokines in parametrial and subcutaneous WAT depots and their plasma and cerebrospinal fluid concentration in non pregnant rats, and in pregnant rats by days 8, 15 and 19 of pregnancy. Tissue content of both adipokines was enhanced 5-6 times by day 8 till the end of pregnancy in parametrial WAT, whereas the increase took place by day 15 in subcutaneous WAT. No increase in tissue release was detected suggesting a local action. Plasma concentration of IL-6 was enhanced by day 8 till the end of pregnancy suggesting sources other than WAT. IL-6 concentration in cerebrospinal fluid paralleled the increases in plasma by days 8 and 15 suggesting a systemic origin. However, it turned down to basal levels by day 19 suggesting central resistance. TNF- α was not detected either in plasma or in cerebrospinal fluid. These results made us to conclude that across pregnancy adipokines control fat deposition in WAT depots in a time-dependent and a depot dependent way. They do it both directly, by local production, and indirectly, by activating the central control of energy expenditure.

Resultados y Discusión

Introduction

The knowledge of the physiology of white adipose tissue (WAT) has increased substantially during the last decade. Adipocytes are no longer considered passive energy stores but producers of endocrine and paracrine molecules that actively contribute to control food intake, energy expenditure and lipids and carbohydrates metabolism. These molecules are collectively termed adipokines (Ronti *et al.* 2006). It has also become clear that in states of excess of fat mass –as present in obese animals- the production of adipokines is altered, thus contributing to the deregulated lipids and carbohydrates metabolism characteristic of the obese state and to insulin resistance (Yu & Ginsberg 2005). From an histological point of view, the fat depots of the obese animals are profusely infiltrated of macrophages –a state of low grade chronic inflammation- which also contributes to the production of some adipokines in WAT depots, especially in the visceral ones (Bastard *et al.* 2006).

IL-6 is an adipokine whose plasma concentration is correlated with total fat mass (Bastard *et al.* 2000). Moreover, a 10-30% of its plasma content in obese animals comes from WAT (Mohamed-Ali *et al.* 1997). However, main IL-6 WAT production does not take place in mature adipocytes but in cells of the stroma-vascular fraction including preadipocytes, endothelial cells and monocytes-macrophages (Fain *et al.* 2004). Besides, IL-6 production is not homogeneous but greater in visceral than in subcutaneous fat (Fried *et al.* 1998). IL-6 receptors are present in many cellular types. They belong to the cytokines receptors class I family that use the Jak/Stats signalling pathway. It is already known that those receptors signalling pathway interferes with that of insulin so that IL-6 has been related to insulin resistance development (Ihle *et al.* 1995, Mooney *et al.* 2001). In fact, IL-6 infusion increases glycaemia and produces insulin resistance (Tsigos *et al.* 1997). In WAT, IL-6 diminishes LPL activity and increases lipolysis thus increasing

Resultados y Discusión

fatty acids in plasma favouring lipotoxicity and thus insulin resistance (Greenberg *et al.* 1992). It also decreases adiponectin synthesis and release thus contributing indirectly to insulin resistance (Fasshauer *et al.* 2003).

IL-6 has not only systemic effects related to metabolic control but also central ones. IL-6 deficient-mice develop mature-onset obesity which is corrected with physiological replacement doses (Wallenius *et al.* 2002). ICV administration but not peripheral one increases energy expenditure through the activation of the sympathetic nervous system, reducing body weight and the mass of individual WAT depots (Jansson *et al.* 2003, Li G. *et al.* 2002a, Wernstedt *et al.* 2006). The presence of IL-6 receptors in the hypothalamus signals it as the target for the central actions of IL-6 in controlling energy expenditure (Li G. *et al.* 2002a). Whether or not IL-6 is produced centrally or comes from peripheral levels is unknown although systemic injection of IL-6 produces activation markers in hypothalamus (Li G. *et al.* 2002a, Schobitz *et al.* 1993). Nonetheless, in obese humans there is no correlation between plasma and cerebrospinal levels (Jansson *et al.* 2003, Stenlof *et al.* 2003).

TNF- α is produced in several cellular types but macrophages are the main one. In WAT, TNF- α is also produced by mature adipocytes and by the stroma-vascular cells. TNF- α plasma concentration is low even in obese animals with no correlation with fat mass. However, there is a positive correlation between TNF- α expression and fat mass indicating that TNF- α acts in a paracrine and an autocrine way in WAT depots (Jellema *et al.* 2004). In fact, the administration of circulating antibodies for TNF- α does not improve glycemia or insulin sensitivity (Ofei *et al.* 1996). Indeed, TNF- α has been related with the genesis of insulin resistance both directly and indirectly. TNF- α interferes with insulin receptors signalling pathway thus decreasing directly insulin action (Peraldi *et al.* 1996). But it also decreases adiponectin and increases IL-6 synthesis

Resultados y Discusión

thus contributing indirectly to insulin resistance (Ruan *et al.* 2002). TNF- α also increases lipolysis with the concomitant increase in the plasma concentration of fatty acids thus favouring lipotoxicity and indirectly insulin resistance again (Yu & Ginsberg 2005).

We have previously shown that during pregnancy there is an increase in visceral WAT mass resembling obese-states. However, the increase is not linear but takes place only in the last week of pregnancy with a different pattern in every WAT depot (Caja *et al.* 2005a, Rocha *et al.* 2003). On the other hand, as a way to redistribute substrates, maternal insulin sensitivity changes from an enhanced state during the first half of pregnancy to a reduced one at the end of pregnancy (Caja *et al.* 2005a). Our group has previously studied the changes of other adipokines during pregnancy in rats. We showed that changes in fat mass and in insulin responsiveness during pregnancy are correlated with changes in resistin expression and plasma concentration thus suggesting a role for resistin in controlling metabolic changes during pregnancy. We failed, however, to find any change in adiponectin parameters (Caja *et al.* 2005a, Caja *et al.* 2005b). Considering the involvement of IL-6 and TNF- α in governing insulin sensitivity, we analyzed possible changes of IL-6 and TNF- α parameters in pregnant rats in an attempt to relate these adipokines with the changes in fat mass and insulin sensitivity that takes place during pregnancy.

Materials and Methods

Animals

Female Wistar rats weighing 180-200g were housed at 22°C in individual cages, with water and food (A04 Panlab, Spain) freely available and with a 12h light/12h dark cycle (lights on at 8 a.m.). The stage of the oestrus cycle was assessed daily to determine the reproductive status of the animals. To obtain pregnant animals, a female was housed with a male for 4 hours on the morning of oestrus. Mating was indicated by the presence of sperm in the vaginal smears. The

Resultados y Discusión

day of mating was considered day 0 of pregnancy. Non-pregnant rats at diestrus were used for representing day 0 of pregnancy. Animals were cared for and used in accordance with the University Bioethical Committee guidelines that follow the principles of the Council of European Communities (86/609 EEC).

Sample collection

At days 0, 8, 15 and 19 of pregnancy, animals were killed by decapitation between 10-12 a.m. Just before sacrifice, CSF (cerebrospinal fluid) was obtained under halothane anaesthesia by inserting a 23-gauge butterfly needle into the *cisterna magna*. Only samples with no blood contamination were processed. Trunk blood was collected at the time of decapitation, allowed to clot, centrifuged to obtain serum and stored at -80°C until analysis.

Tissue content

A fragment of either parametrial or subcutaneous WAT was homogenized in phosphate buffer (1g in 1ml), centrifuged at 3,400g and the infranatant was assayed for the corresponding adipokine.

Tissue release

Parametrial WAT was obtained in aseptic conditions, minced with scissors and a fragment of 250 mg was incubated at 37°C in 1ml of Krebs-Ringer-Phosphate (pH 7.4) with glucose (1mg/ml) and albumin (2%, w/v). After 8h of incubation, the medium was recovered and stored at -80°C until analysis.

Resultados y Discusión

Plasma and CSF measurements

IL-6 concentration was measured with the rat immunoassay kit developed by Biosource (Camarillo, California, USA). The limit of sensitivity was <8 pg/ml and the limit of linearity 1,536 pg/ml. The intra-assay coefficients of variation provided by the manufacturer were 3.93% and 4.9% for serum samples containing 233.4 and 1,530.9 pg/ml, respectively. The inter-assay coefficients of variation provided by the manufacturer were 9.9% and 5.9% for serum samples containing 213.6 and 1,515.2 pg/ml, respectively. No dilution or concentration was necessary for serum, CSF samples or for the infranatants obtained for tissue content determinations. The incubation mediums for tissue release determinations were diluted 1:3 with the standart diluent buffer provided with the kit.

TNF- α concentration was measured with the rat immunoassay kit developed by HyCult biotechnology (Uden, The Netherlands). The limit of sensitivity was <8 pg/ml and the limit of linearity 2,000 pg/ml. The intra and inter-assay coefficients of variation were not provided by the manufacturer. Samples for measurement of plasma concentration, tissue content and release were used as they were.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) with time of pregnancy as a factor –non-pregnant rats representing day 0 of pregnancy- was used for comparing tissue content and release, of both IL-6 and TNF- α . A Student-Newman-Keuls (SNK) test was used for *post-hoc* comparisons. A Kruskal-Wallis test was used for comparing either plasma or CSF concentration of IL-6. $P<0.05$ was considered statistically significant throughout. In figures and tables, differences have been indicated by letters so that data with an “a” is different from those with a “b” but are the same as “a,b”.

Resultados y Discusión

Results

Figure 1A shows that IL-6 content in parametrial WAT of non-pregnant rats was about 80 pg/100 mg tissue. Such content was increased eight times in pregnant rats irrespective of the day of sampling. Figure 1B also shows that IL-6 release to the medium from the tissue fragments was unchanged despite the big increase in tissue content. A more modest (x 1.5 times) increase in IL-6 content was also observed in subcutaneous WAT but only at the end of pregnancy (day 19) (Fig 2A). Again, IL-6 release was unchanged by pregnancy in subcutaneous WAT (Fig 2B).

In the course of pregnancy, plasma concentration of IL-6 increased during the first two weeks to be maintained in the last week (Fig 3). IL-6 was detected in CSF but its concentration was lower than that found in plasma. We also observed an increase during the first two weeks but, contrary to plasma, it was substantially decreased at the end of pregnancy (Fig 3).

TNF- α was also detected in WAT. As well as the other adipokine analyzed, TNF- α content in WAT was enhanced during the whole pregnancy in parametrial WAT (x2.5 times) but only in the second half in subcutaneous WAT (Fig 4). Although TNF- α release from WAT was only measured in the parametrial depot, no changes were observed between non-pregnant and pregnant rats (Fig 4C). Although TNF- α was measured in plasma of both pregnant and non-pregnant rats, it was not detected despite the high sensitivity of the kit used (data not shown).

Discussion

This study shows that IL-6 and TNF- α are present in both parametrial –visceral- and subcutaneous WAT of non pregnant rats. Their abundance was different, so that TNF- α was present in tens of pg per 100 mg tissue whereas IL-6 was in hundreds of pg per 100 mg tissue. These results indicate a basal production of both adipokines even when no net fat accumulation – except

Resultados y Discusión

that of a young animal growing normally- is taking place. Since the stroma-vascular fraction is the main source of both adipokines, the involvement of this cellular fraction in the basal production of the adipokines studied is inferred.

Pregnancy seems to be a stimulus big enough to enhance tissue adipokine production, particularly in visceral fat whose adipokine content was found to be increased eight days after pregnancy began. Subcutaneous fat took longer to increase its tissue content underlining previous observations showing that IL-6 production is greater in visceral than in subcutaneous fat (Fried *et al.* 1998) and highlighting that WAT cannot be viewed as a single physiological unit but a collection of them (Caja & Puerta 2007). Fat accretion has been suggested to be related causally with alterations in adipokines production (Trayhurn & Wood 2004). Indeed, dozens of genes are upregulated after one week on a high fat diet (Li J. *et al.* 2002b). However, it is difficult to claim such explanation for the early increases observed in TNF- α and IL-6 detected in WAT of pregnant rats since –as we have shown earlier (Caja *et al.* 2005a)- fat accumulation both in visceral and subcutaneous depots takes place only during the third week of pregnancy, this is, later than the observed increases in TNF- α and IL-6 tissue content took place. Therefore, the early adipokines response indicates quick stimuli for adipokines production other than those claimed for an expanding fat depot. Whether or not pregnancy related hormones are involved in this issue remains to be investigated. Meaningfully, no increase in the tissue release of both adipokines was detected at any time of pregnancy despite the increased tissue contents. Therefore, it suggests a local role for such increases. Indeed, in other studies WAT mass correlates with TNF- α expression but not with plasma levels indicating paracrine or/and autocrine actions (Jellema *et al.* 2004).

Both IL-6 and TNF- α are known to interfere with insulin signalling. In turn, insulin stimulates LPL activity and lipogenesis in adipocytes so contributing to fat accumulation. Therefo-

Resultados y Discusión

re, the rapid increase in IL-6 and TNF- α WAT content in pregnant rats probably reduces insulin sensitivity in adipocytes thus reducing lipids accumulation and diverting lipids to other tissues. This explanation agrees with the either unchanged or even decreased mass of main WAT depots during the first two weeks of pregnancy (Caja *et al.* 2005a) despite the already enhanced increase in food intake (Abelenda & Puerta 1987, Rocha *et al.* 2003) and the reported increase in total carcass fat content in early pregnancy (Lopez-Luna *et al.* 1991). During the third week, the ensuing hyperinsulinemia (Ramos *et al.* 2003) could exceed this brake resulting in lipid accumulation thus increasing mass depot (Caja *et al.* 2005a). Certainly, both WAT and skeletal muscles are insulin resistant in late pregnancy (Leturque *et al.* 1986), but in early pregnancy –when total insulin sensitivity is enhanced- the higher mass of skeletal muscle (x 3 times) could mask the reduced sensitivity of visceral adipocytes suggested by this study. This reasoning is further supported by the fact that most studies dealing with insulin sensitivity during pregnancy have been carried out with *in vivo* tests using whole animals or humans (Caja *et al.* 2005a, Kirwan *et al.* 2002, Ramos *et al.* 2003). On the contrary, opposing to our proposal is a recent study showing that white adipocytes from late pregnant rats are less responsive to insulin than those isolated from early pregnant rats (Ramos *et al.* 2003). Nonetheless, regional differences probably made this discrepancy only apparent. In fact, our study shows a quick enhancement of adipokines content in visceral fat but a late one in subcutaneous fat. The opposing study (Ramos *et al.* 2003) used lumbar WAT, which is considered metabolically in between visceral and subcutaneous (Arner 1997) suggesting an intermediate appearance of adipokines content increase. Thus, our results together with those already published on the issue raise the possibility that the insulin sensitivity of adipocytes from pregnant rats could be governed by local production of IL-6 and TNF- α in both a time-dependent and depot dependent way.

Resultados y Discusión

It is noteworthy that despite no change in the tissue release of both adipokines, a high increase in plasma levels of IL-6 was observed indicating sources other than WAT. Placenta is a rich source of adipokines that are released to the maternal circulation –IL-6 and TNF- α among them –(Benyo *et al.* 2001, Lepercq *et al.* 2001, Malek *et al.* 2001). A prevalent hypothesis is that the placenta-released cytokines contribute to the metabolic changes of the mother (Hauguel-de Mouzon & Guerre-Millo 2006). Indeed, plasma TNF- α in pregnant women correlates with insulin resistance (Kirwan *et al.* 2002). Our suggestion about a local control of white adipose tissue insulin sensitivity together with the high plasma levels of IL-6 in the last third of pregnancy, when the insulin sensitivity of the whole animal decreases made us to argue that placental adipokines control of insulin sensitivity is mainly directed to skeletal muscle whose insulin sensitivity is also highly reduced in late pregnancy (Leturque *et al.* 1986).

In our pregnant rats both plasma and CSF levels were increased regularly during the first two weeks of pregnancy. Later on, plasma concentration was maintained at a high level but CSF was decreased to the values found in controls. These observations set the following question. Does CSF IL-6 come from that in plasma? Since systemic injection of IL-6 produces activation markers in hypothalamus (Li G. *et al.* 2002a, Schobitz *et al.* 1993) the answer could be yes for the two first week of pregnancy. However, another explanation is needed for the third week. Perhaps, our results are reflecting late central IL-6 resistance, a fact similar to that described for leptin in pregnant animals whose central nervous system becomes leptin resistant at the end of pregnancy –when leptinemia increases- thus avoiding the suppressive effects of leptin in food intake (Ladyman & Grattan 2004). Whatever the reason, the inferred role of the enhanced levels of IL-6 in CSF of pregnant rats agrees with the local control of insulin sensitivity proposed previously. In other words, at central levels, IL-6 is known to stimulate sympathetic nervous system activity (Jansson *et al.* 2003, Li G. *et al.* 2002a, Wernstedt *et al.* 2006). In turn, it enhances adi-

Resultados y Discusión

pocytes lipolysis thus reducing lipids deposition -as local IL-6 does-. This effect would take place for the first two weeks of pregnancy. Later on, the recovery of control levels of CSF IL-6 in the third week would allow fat deposition in WAT depots, as we have demonstrated that occurs (Caja *et al.* 2005a).

In summary, our results show that in pregnant rats there is an intense local production of both IL-6 and TNF- α that is time and depot-dependent. It probably modulates local lipid and carbohydrates metabolism in individual depots by reducing insulin sensitivity. Plasma levels of IL-6 are enhanced during the whole pregnancy period. This plasma IL-6 is probably from placental origin and probably governs muscle insulin sensitivity. The progressive increase in IL-6 plasma concentration during the first two weeks of pregnancy is paralleled by similar increased in IL-6 CSF concentration suggesting a systemic origin. Central IL-6 probably reinforces local action by activating SNS and reducing lipolysis. However, during the third week, CSF IL-6 concentration turns back to control levels despite the maintenance of the high plasma concentration thus suggesting central IL-6 resistance.

Adnowledgements

This work was supported by grant BFI2003-01414 from MCyT given to Marisa Puerta. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Abelenda M & Puerta M 1987 Inhibition of diet-induced thermogenesis during pregnancy in the rat. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology* **409** 314-317.
- Arner P 1997 Regional adiposity in man. *Journal of Endocrinology* **155** 191-192.

Resultados y Discusión

- Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H & Hainque B 2000 Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism* **85** 3338-3342.
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J & Feve B 2006 Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network* **17** 4-12.
- Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C & Conrad KP 2001 Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism* **86** 2505-2512.
- Caja S & Puerta M 2007 Control by reproduction-related hormones of resistin expression and plasma concentration. *Hormone and Metabolic Research*. In press
- Caja S, Martínez I, Abelenda M & Puerta M 2005a Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats. *Journal of Endocrinology* **185** 551-559.
- Caja S, Torrente M, Martínez I, Abelenda M & Puerta M 2005b Adiponectin values are unchanged during pregnancy in rats. *Journal of eEndocrinological Investigation* **28** 609-615.
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P & Bahouth SW 2004 Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145** 2273-2282.
- Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J & Paschke R 2003 Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **301** 1045-1050.
- Fried SK, Bunkin DA & Greenberg AS 1998 Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 847-850.

Resultados y Discusión

Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO & Jablons D 1992 Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Research* **52** 4113-4116.

Hauguel-de Mouzon S & Guerre-Millo M 2006 The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta* **27** 794-798.

Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K & Silvennoinen O 1995 Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annual Review of Immunology* **13** 369-398.

Jansson JO, Wallenius K, Wernstedt I, Ohlsson C, Dickson SL & Wallenius V 2003 On the site and mechanism of action of the anti-obesity effects of interleukin-6. *Growth Hormone and IGF Research* **13 Suppl A** S28-32.

Jellema A, Plat J & Mensink RP 2004 Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *European Journal of Clinical Investigation* **34** 766-773.

Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalkan SC & Catalano PM 2002 TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* **51** 2207-2213.

Ladyman SR & Grattan DR 2004 Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* **145** 3704-3711.

Lepercq J, Challier JC, Guerre-Millo M, Cauzac M, Vidal H & Hauguel-de Mouzon S 2001 Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin. *Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism* **86** 2409-2413.

Leturque A, Ferré P, Burnol AF, Kande J, Maulard P & Girard J 1986 Glucose utilization rates and insulin sensitivity *in vivo* in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* **35** 172-177.

Resultados y Discusión

Li G, Klein RL, Matheny M, King MA, Meyer EM & Scarpace PJ 2002a Induction of uncoupling protein 1 by central interleukin-6 gene delivery is dependent on sympathetic innervation of brown adipose tissue and underlies one mechanism of body weight reduction in rats. *Neuroscience* **115** 879-889.

Li J, Yu X, Pan W & Unger RH 2002b Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* **282** E1334-1341.

Lopez-Luna P, Maier I & Herrera E 1991 Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biology of the Neonate* **60** 29-38.

Malek A, Sager R & Schneider H 2001 Effect of hypoxia, oxidative stress and lipopolysaccharides on the release of prostaglandins and cytokines from human term placental explants. *Placenta* **22 Suppl A** S45-50.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawest A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S & Coppack SW 1997 Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6 but not tumor necrosis factor- α , *in vivo*. *Journal of Endocrinological Metabolism* **82** 4196-4200.

Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y & Furlanetto RW 2001 Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry* **276** 25889-25893.

Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M & Taylor R 1996 Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* **45** 881-885.

Resultados y Discusión

- Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF & Spiegelman BM 1996 Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *The Journal of Biological Chemistry* **271** 13018-13022.
- Ramos MP, Crespo-Solans MD, del Campo S, Cacho J & Herrera E 2003 Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* **285** E318-328.
- Rocha M, Bing C, Williams G & Puerta M 2003 Pregnancy-induced hyperphagia is associated with increased gene expression of hypothalamic agouti-related peptide in rats. *Regulatory Peptides* **114** 159-165.
- Ronti T, Lupattelli G & Mannarino E 2006 The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology* **64** 355-365.
- Ruan H, Hacoen N, Golub TR, Van Parijs L & Lodish HF 2002 Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* **51** 1319-1336.
- Schobitz B, de Kloet ER, Sutanto W & Holsboer F 1993 Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *European Journal of Neuroscience* **5** 1426-1435.
- Stenlof K, Wernstedt I, Fjallman T, Wallenius V, Wallenius K & Jansson JO 2003 Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism* **88** 4379-4383.
- Trayhurn P & Wood IS 2004 Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition* **92** 347-355.

Resultados y Discusión

Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS & Chrousos GP 1997 Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism* **82** 4167-4170.

Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C & Jansson JO 2002 Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature Medicine* **8** 75-79.

Wernstedt I, Edgley A, Berndtsson A, Faldt J, Bergstrom G, Wallenius V & Jansson JO 2006 Reduced stress- and cold-induced increase in energy expenditure in interleukin-6-deficient mice. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **291** R551-557.

Yu YH & Ginsberg HN 2005 Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circulation Research* **96** 1042-1052.

Resultados y Discusión

Figure 1. IL-6 content and release from parametrial WAT of both non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times of pregnancy. A) A fragment of parametrial WAT was removed, homogenized in phosphate buffer and IL-6 was measured in the infranatant after centrifugation to eliminate lipids. B) A fragment of parametrial WAT was removed and incubated for 8 hours. IL-6 was measured in the incubation medium. Bars represent mean \pm S.E.M. of 5-7 animals. Different letter represent $P < 0.5$ when compared by one-way ANOVA using SNK as a *post hoc* test.

Figure 2. IL-6 content and release from subcutaneous WAT of both non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times of pregnancy. A) A fragment of subcutaneous WAT was removed, homogenized in phosphate buffer and IL-6 was measured in the infranatant after centrifugation to eliminate lipids. B) A fragment of subcutaneous WAT was removed and incubated for 8 hours. IL-6 was measured in the incubation medium. Bars represent mean \pm S.E.M. of 5-7 animals. Different letter represent $P < 0.05$ when compared by one-way ANOVA using SNK as a *post hoc* test.

Figure 3. IL-6 concentration in plasma and in cerebrospinal fluid of both non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times of pregnancy. Bars represent mean \pm S.E.M. of 8 animals. Different letters represent $P < 0.05$ when compared by Kruskal-Wallis test.

Figure 4. TNF- α content and release from parametrial and subcutaneous WAT from both non-pregnant (day 0) and pregnant rats at different times of pregnancy. A) A fragment of either parametrial or subcutaneous WAT was removed, homogenized in phosphate buffer and TNF- α was measured in the infranatant after centrifugation to eliminate lipids. B) A fragment of parametrial WAT was removed and incubated for 8 hours. TNF- α was measured in the incubation medium.

Resultados y Discusión

Bars represent mean \pm S.E.M. of 8 or 5 animals for content or release values, respectively.

Different letter represent $P < 0.05$ when compared by one-way ANOVA using SNK like a *post hoc* test.

Resultados y Discusión

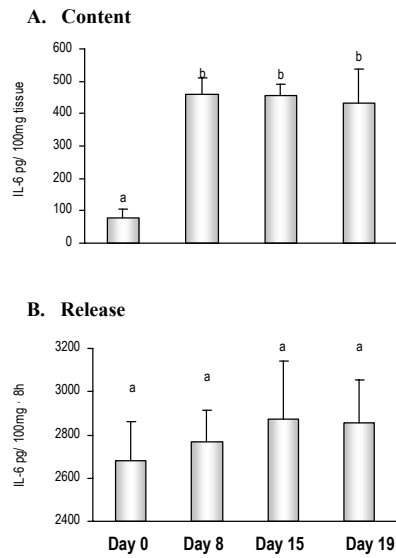


Figure 1.

Resultados y Discusión

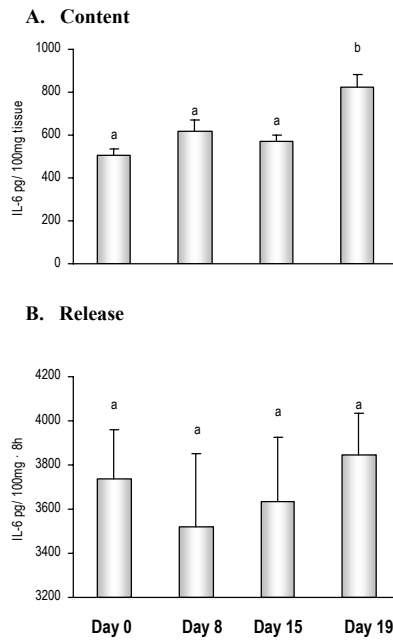


Figure 2.

Resultados y Discusión

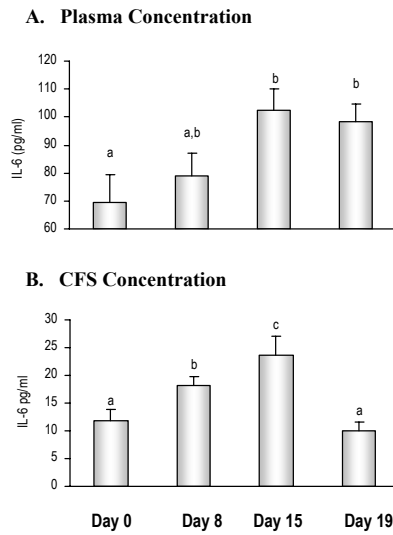


Figure 3.

Resultados y Discusión

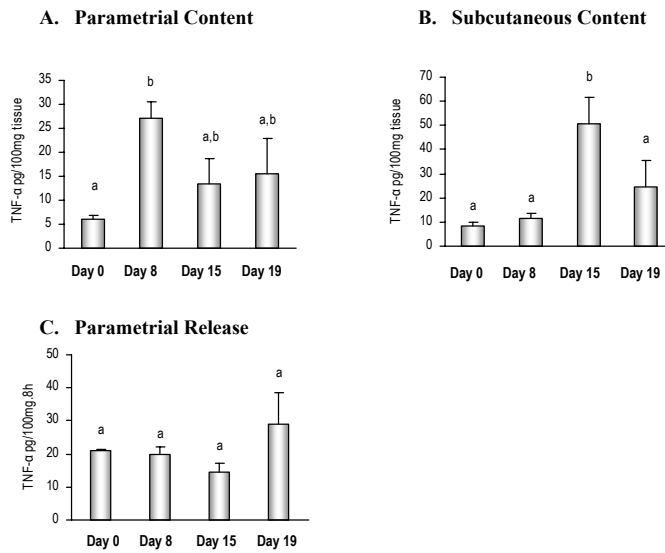


Figure 4.

Resultados y Discusión

6. Otros datos no publicados.

A continuación, se presentan algunos otros resultados que no han sido publicados y que completan los experimentos realizados. Habida cuenta de los resultados obtenidos en el artículo 2, en el que los cambios de expresión no suponen cambios en la liberación, también medimos el contenido en la WAT y la liberación de resistina tras un tratamiento con estradiol (figuras anexas 1 y 2). El depósito parametrial contuvo menos resistina en comparación con su control, mientras que sólo el depósito inguinal, liberó una concentración menor de resistina en comparación con su control. Por otro lado, se analizó el contenido de resistina en los depósitos parametrial, inguinal y retroperitoneal tras un tratamiento con hCG (figura anexa 3). Los depósitos inguinal y retroperitoneal contuvieron del orden de 2,5 veces más resistina que sus controles, mientras que el parametrial no experimentó variación alguna. A su vez, tan sólo el depósito retroperitoneal libera más resistina, al tratarse los animales con hCG (figura anexa 4).

Finalmente, siendo la prolactina una de las hormonas predominantes en la primera mitad de la gestación de la rata, decidimos analizar su efecto en relación con la resistina. La figura anexa 5, muestra la expresión de resistina en tres depósitos de WAT, es decir, parametrial, inguinal y retroperitoneal, al aplicar dos diferentes tratamientos con prolactina. Así, la expresión de la proteína se vio disminuida en los depósitos parametrial y retroperitoneal, mientras que en el inguinal sólo disminuyó tras el tratamiento con 600 μ g de prolactina. Por el contrario los 3 depósitos analizados no mostraron variaciones en la cantidad de resistina que liberan durante 24 horas (figura anexa 6). En la sangre, la concentración de resistina, se vio disminuida tras el tratamiento, existiendo diferencias significativas entre grupos (control, 600 μ g y 300 μ g, - figura anexa 7-).

Resultados y Discusión

Contenido de Resistina

A. Parametrial

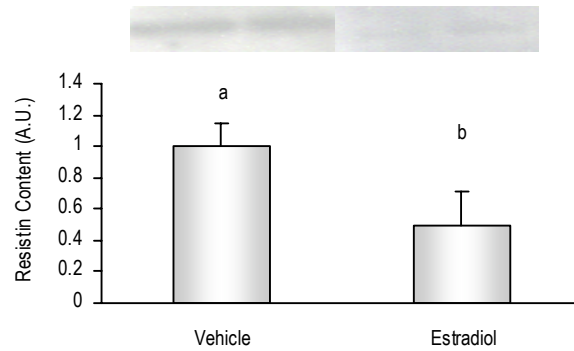
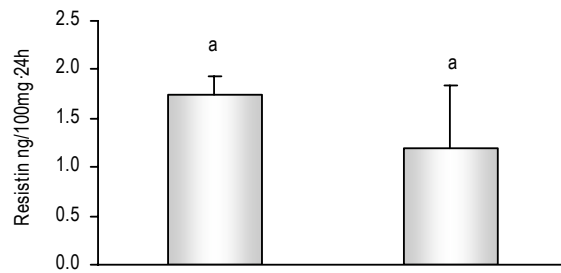


Figura anexa 1. Contenido en resistina del depósito parametrial de la WAT, cuantificado en unidades arbitrarias (A.U.), mediante western blot, tras un tratamiento con estradiol. Las barras representan el valor de la media \pm E.M.E de 6 animales. Las diferentes letras representan valores de $p < 0.05$ cuando se comparan los grupos mediante una U de Mann-Whitney.

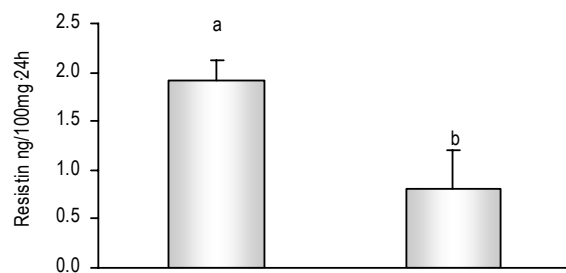
Resultados y Discusión

Liberación de Resistina

A. Parametrial



B. Inguinal



C. Retroperitoneal

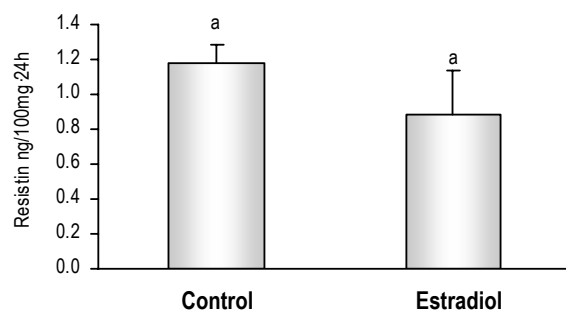
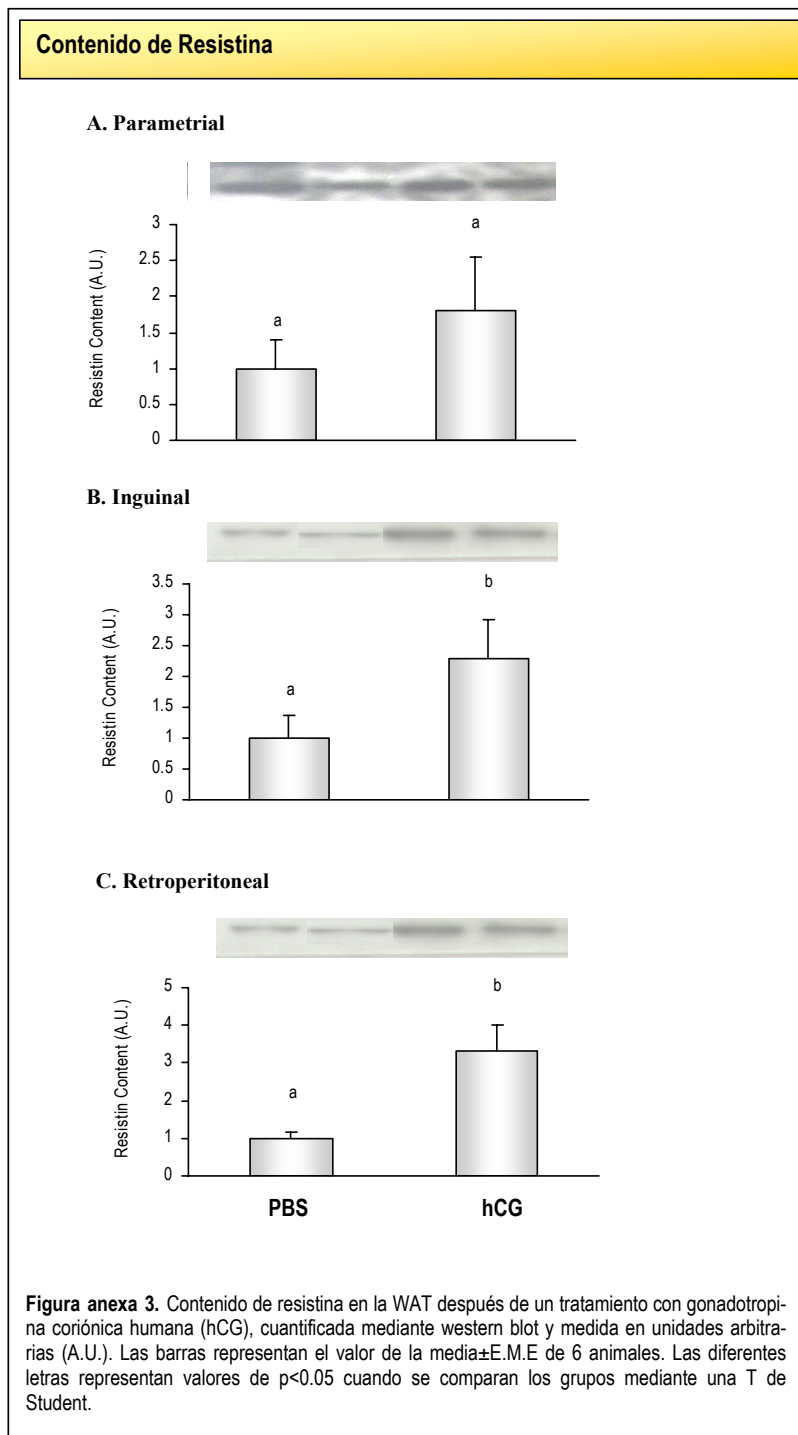
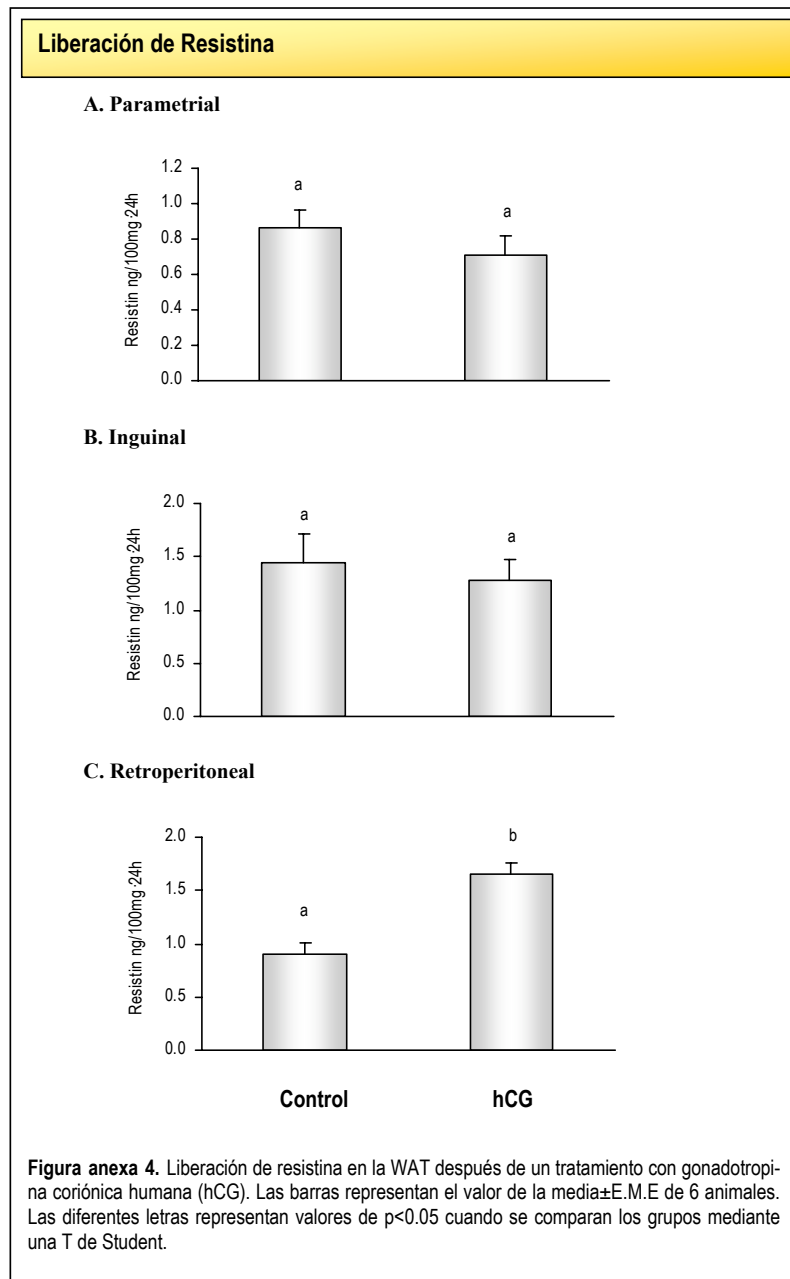


Figura anexa 2. Liberación de resistina en diferentes depósitos de la WAT después de un tratamiento con estradiol. Las barras representan el valor de la media \pm E.M.E de 6 animales. Las diferentes letras representan valores de $p < 0.01$ cuando se comparan los grupos mediante una U de Mann-Whitney.

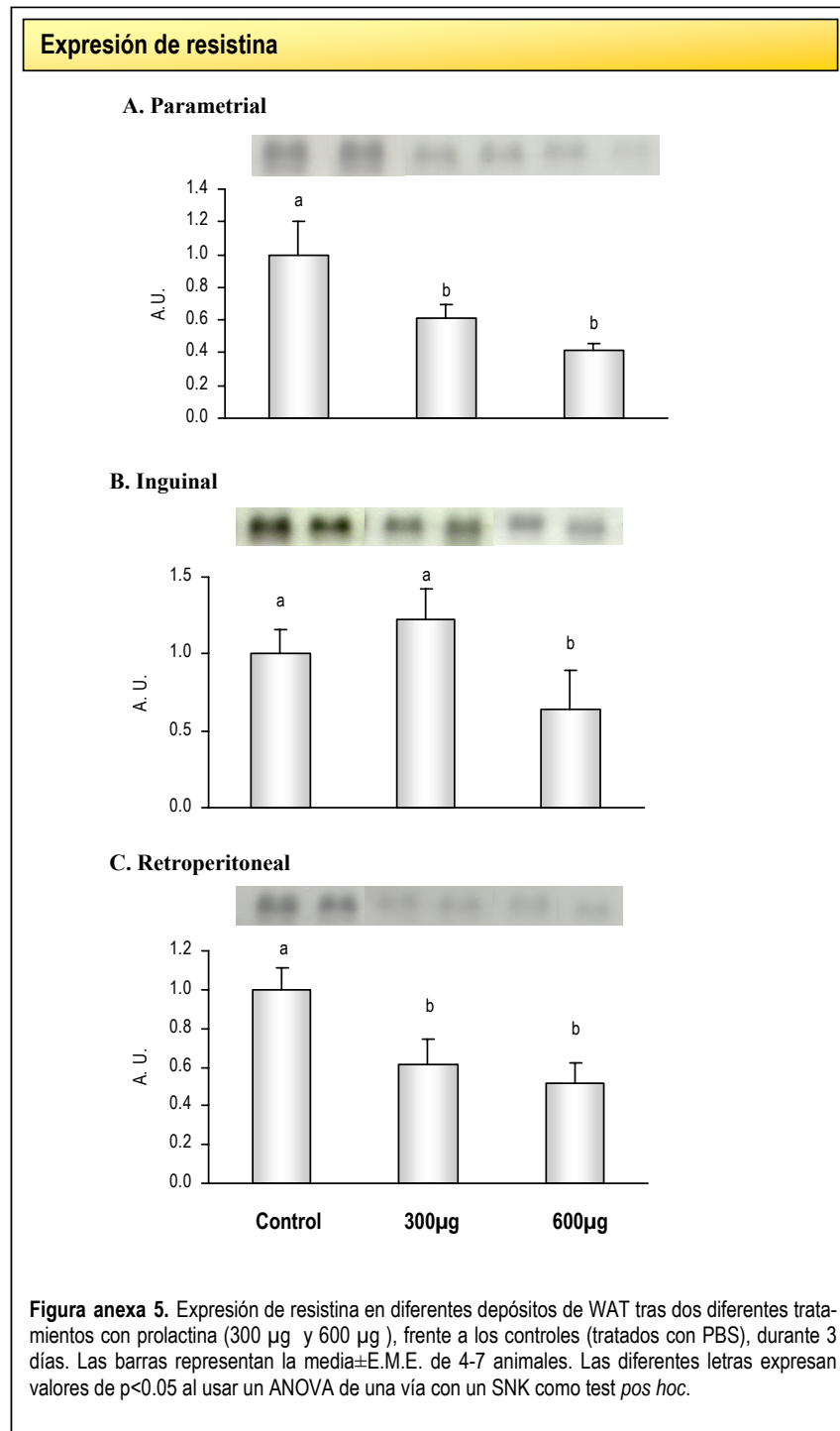
Resultados y Discusión



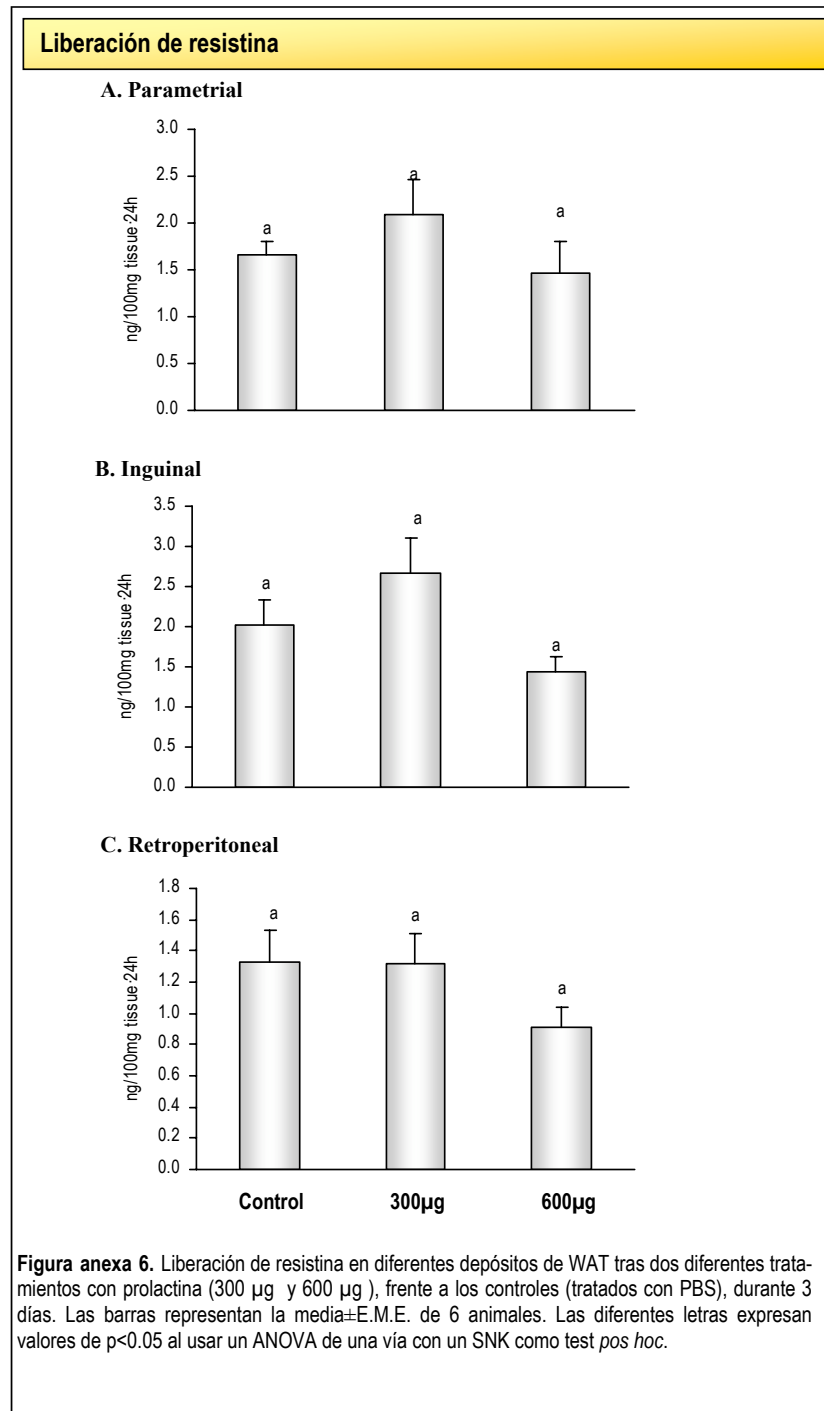
Resultados y Discusión



Resultados y Discusión



Resultados y Discusión



Resultados y Discusión

Concentración de resistina en suero

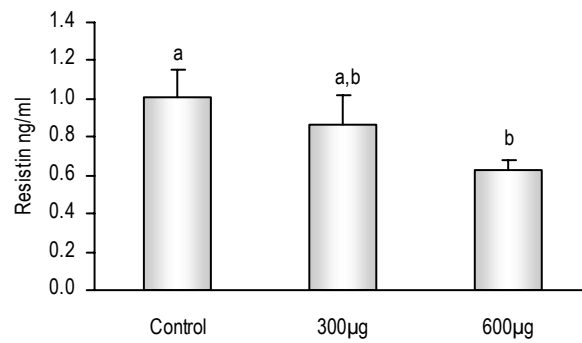


Figura anexa 7. Concentración de resistina en el suero de ratas tras un tratamiento de 3 días con prolactina. La hormona se suministró a diferentes concentraciones en ratas hembras que se encontraban en diestro II. Las letras reflejan diferencias significativas entre los grupos, al aplicar un ANOVA de una vía usando un SNK como test pos hoc.

II. Discusión de los resultados.

Durante la gestación, existe un crecimiento tanto materno como fetal que se logra mediante el incremento de la ingestión de alimento, así como por un reparto de sustratos (Abelenda & Puerta, 1987). El crecimiento materno, se traduce en un estado de hiperfagia, lo que implica un aumento tanto del peso corporal como de la WAT (Douglas *et al.*, 2007, Rocha *et al.*, 2003, Shirley, 1984). En efecto, las ratas gestantes en nuestros experimentos, sufrieron este incremento en su peso corporal, (exp. 1 fig. 1 p.53, exp. 2 fig. 1 p.61), no sólo por las aportaciones de los fetos sino porque en sí mismas aumentaron su masa, como se observa en el exp. 2 fig. anexa 8 p.68. En este contexto, el peso de los depósitos de la WAT se vio incrementado de una manera significativa, sobre todo al final de la gestación (expe. 1 fig. 2 p.53, expe. 2 fig. 3 p.62). Este es un mecanismo fisiológico (aumento del peso corporal e incremento de la WAT), para adecuarse a los nuevos requerimientos metabólicos en las madres gestantes y para proveer de reservas energéticas, necesarias no sólo en la gestación, sino también durante la lactación (Douglas *et al.*, 2007). Debido a esto, las gestantes experimentan cambios en la sensibilidad a la insulina, pasando de un estado de sensibilidad aumentada al comienzo de la gestación a un estado de resistencia al final de la misma (Leturque *et al.*, 1987, Leturque *et al.*, 1986). Estas variaciones en la sensibilidad a la insulina se encontraron en nuestros experimentos, mostrando un incremento de sensibilidad en la primera semana de gestación para disminuir hacia el final (exp. 1 fig. 3 p.54, exp. 2 fig. 2 p.61). A su vez, la expresión de los receptores GLUT 4 en *soleus*, se vio aumentada hacia el final de la gestación (exp. 2 fig. anexa 9 p.69). Este mecanismo ocurre como respuesta fisiológica a la resistencia a la insulina, ya que si esta sigue aumentando, el

Resultados y Discusión

final de la gestación implicaría el desarrollo de diabetes. Así, la sobre expresión de los transportadores GLUT 4 permite una mejor captación de glucosa por parte de las madres, ya que favorece la sensibilidad a la insulina (Carvalho *et al.*, 2005, Im *et al.*, 2007). Debido a estas variaciones en el peso de los depósitos de la WAT, así como de la sensibilidad-resistencia a la insulina, cabe preguntarse ¿existirá alguna variación en los niveles de las adipocinas?. Es por ello que surgen las tres hipótesis, punto de partida del presente trabajo, que pasamos a citar nuevamente:

1. Determinar los niveles de adiponectina durante la gestación, para así relacionarlos con los cambios ocurridos en la sensibilidad a la insulina y la masa de la WAT.
2. Determinar los niveles de resistina durante la gestación, para así relacionarlos con los cambios ocurridos en la sensibilidad a la insulina y la masa de la WAT.
3. Determinar los niveles de TNF- α e IL-6 durante la gestación, para así relacionarlos con los cambios ocurridos en la sensibilidad a la insulina y la masa de la WAT.

La adiponectina es una proteína producida por el tejido adiposo, que se ha implicado entre otros procesos con la obesidad y la resistencia a la insulina y por tanto con el desarrollo de la diabetes tipo II (Lara-Castro *et al.*, 2007). En ratones *ob/ob*, en ratas obesas Zucker y en humanos, se da una menor expresión de la adiponectina en la WAT cuando aumentan los depósitos de grasa (Altomonte *et al.*, 2003, Arita *et al.*, 1999, de Assis *et al.*, 2006, Hotta *et al.*, 2000, Hu *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 2007, Lara-Castro *et al.*, 2007). En nuestros resultados, el incremento de la WAT no se relacionó

Resultados y Discusión

con un aumento de expresión de adiponectina, de hecho la expresión no se modificó a lo largo de la gestación en comparación con los no gestantes, en ninguno de los depósitos analizados, es decir, ni en los viscerales ni en los subcutáneos (exp. 1 fig. 4 p.54). Este fenómeno ha sido confirmado por otros autores posteriormente a la fecha de nuestra publicación (Josephs *et al.*, 2007). Cuando se estudió el contenido de la WAT en adiponectina, así como la liberación de la misma (exp. 1 fig. 5 p.55), no se observaron diferencias entre las gestantes y las no gestantes. De acuerdo con estos datos, la concentración de la hormona en el suero no se vio alterada (exp. 1 table 1 p.55), a diferencia de lo que ocurre al final de la gestación tanto en ratones como en humanos, donde los valores de la proteína se encuentran disminuidos (Catalano *et al.*, 2006, Combs *et al.*, 2003). Incluso, las mujeres con diabetes gestacional, tienen niveles de adiponectina disminuidos cuando se comparan con la gestación normal (Worda *et al.*, 2004, Thyfault *et al.*, 2005), cosa que no ocurrió en nuestro modelo en el periodo de resistencia a la insulina, al final de la gestación (exp. 1 fig. 3 p.54, exp. 2 fig. 2 p.61 y fig. anexa 9 p.69). La adiponectina, se encontró en el CSF de los controles como de las preñadas 1000 veces por debajo de los niveles en sangre (exp. 1 table 1 p.55). Estos hallazgos se relacionan con lo publicado en ratón y en humanos, donde se observan pequeñas cantidades de la hormona en CSF, así como la existencia de receptores hipotalámicos de la misma (Kos *et al.*, 2007, Neumeier *et al.*, 2007). En humanos, se ha observado que la adiponectina puede atravesar la barrera hematoencefálica (Kusminski *et al.*, 2007, Neumeier *et al.*, 2007), pudiendo actuar a nivel del SNC, aunque su papel no está del todo claro (Pan & Kastin, 2007). En nuestros experimentos, los niveles de la hormona en el CSF permanecieron inalterados a lo largo de la gestación e iguales a los de los controles no gestantes. Se sabe, que la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos está influenciada por mecanismos centrales (Bruning *et al.*, 2000,

Resultados y Discusión

Haque *et al.*, 1999, Obici *et al.*, 2002), aunque esto ocurre así, no parece que la adiponectina existente en el CSF juegue un papel en la modulación de la resistencia a la insulina, al menos en el modelo de rata gestante. Este hecho está reforzado por lo publicado en humanos, donde la adiponectina en el CSF no afecta a la resistencia a la insulina (Kos *et al.*, 2007). Parece difícil, a la luz de estos descubrimientos, encontrar un papel para la adiponectina dentro de los cambios ocurridos en la sensibilidad a la insulina durante la gestación en la rata y por tanto es probable que otras adipocinas, actúen como posibles factores reguladores. Una de las adipocinas candidatas para explicar estos fenómenos es la resistina.

La resistina, es una adipocina producida en el tejido adiposo así como en otras localizaciones, que más controvertida parece en sus efectos, propuesta inicialmente como el agente causal de la resistencia a la insulina (Steppan *et al.*, 2001). Como la gestación es un modelo fisiológico de alteraciones de la sensibilidad a la insulina así como de incremento de la WAT, estudiamos el papel de esta adipocina durante este proceso. Con este fin, medimos la expresión de resistina en tres diferentes depósitos de la WAT a diferentes días durante la gestación. Así, la resistina aumentó 15 veces en el depósito parametrial y 4 veces en el retroperitoneal a día 8 de gestación, para disminuir progresivamente al final de la misma, haciéndose similar a los valores encontrados en los controles (exp. 2 fig. 5 p.63). Este proceso ocurre en paralelo a las variaciones del peso de la WAT, en otras palabras, la sobre expresión de resistina a día 8 de gestación coincidió con disminuciones del peso de la WAT en los depósitos parametrial y en el retroperitoneal donde, aun sin haber diferencias significativas, se observó un menor peso (exp. 2 fig.3 p.62). La resistina se ha propuesto como inhibidor de la adipogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (Kim *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2006). Nuestros resultados apuntan a que la sobre expresión de la proteína al comienzo de la gesta-

Resultados y Discusión

ción, puede tener un papel antiadipogénico al menos, a nivel local. Este hecho está reforzado por lo encontrado en el exp. 2 fig. 4 p.63, donde el tamaño de los adipocitos no se modificó durante la gestación, en otras palabras, las variaciones en el peso de los depósitos de WAT, se deben a una disminución o aumento en el número de sus células y no variaciones en su tamaño. Otro hecho que se desprende de los datos de expresión son las diferencias entre depósitos, variando entre los viscerales y los subcutáneos, es decir, los depósitos viscerales dan lugar a una mayor expresión que los subcutáneos. Esta expresión diferencial ha sido encontrada por otros autores (Borst et al., 2005).

Los valores de la proteína también se midieron en el suero tanto de las gestantes como de los controles no gestantes. Así, se observaron valores de concentración disminuidos al comienzo de la gestación, para progresivamente verse aumentados al final de la misma y mantenerse durante la lactación hasta el destete, donde experimentaron una caída a las concentraciones iniciales (exp. 2 table 1 y 2 p.64). La concentración de resistina en el suero no concuerda con la expresión en la WAT, ya que al comienzo de la gestación su expresión fue elevada y su concentración en suero baja, para invertirse al final de la misma. Estas diferencias se ajustan a lo encontrado en otros modelos de ratones obesos, ratones delgados y en ratones con resistencia a la insulina (Lee *et al.*, 2005), donde se atribuye la responsabilidad de la resistencia a la insulina a los altos niveles de la resistina encontrados en la sangre (Chen *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2006). Bajo esta perspectiva, nuestros resultados apuntan en esta dirección ya que la concentración en el suero de la proteína se movió en relación con la variación de la resistencia a la insulina, es decir, al final de la gestación la resistencia a la insulina está aumentada, en paralelo con los elevados niveles de la resistina en sangre (exp. 2 table 1 y 2 p.64, exp. 2 fig. 2 p.61). A su vez, se sabe que la inyección de resistina ori-

Resultados y Discusión

gina resistencia a la insulina en ratones y ratas (Asensio *et al.*, 2004, Nakata *et al.*, 2007, Rajala *et al.*, 2003, Steppan *et al.*, 2001). En definitiva, la resistina es un agente que podría originar la resistencia a la insulina en la rata durante la gestación.

Debido a que la expresión de resistina no se correlaciona con su concentración en el suero, es posible que existan otras fuentes alternativas diferentes de la WAT. La gestación, implica por un lado la formación de la placenta y por otro lado el desarrollo de la glándula mamaria, además se sabe que estos órganos son susceptibles de expresar resistina (Komatsu *et al.*, 2003, Steppan *et al.*, 2001, Yura *et al.*, 2003). Así, analizamos los niveles de la proteína en la glándula mamaria y la placenta al comienzo de la gestación y al final de la misma cuando ambos órganos están muy desarrollados. En la primera parte de la gestación, la expresión en ambos órganos, fue tan elevada como la encontrada en la grasa parametrial (exp. 2 fig. 6 p.64), mientras que al final de la misma, estuvo muy por debajo de la obtenida en la grasa parametrial. Así pues, el incremento en el suero de la resistina al final de la gestación, no parece deberse a las aportaciones de la glándula mamaria y de la placenta, ya que su expresión se encontró muy por debajo de la encontrada en el depósito parametrial. Bajo esta perspectiva, cabe preguntarse si existen otros órganos productores de resistina que no se hayan medido en nuestro trabajo. Esta opción, aunque no es despreciable parece poco probable, ya que el principal órgano productor de la resistina es la WAT (Nogueiras *et al.*, 2003, Rosen & Spiegelman, 2006). Otras posibles explicaciones de este fenómeno son, o bien que la proteína tarde en liberarse del adipocito y/o que se acumule en la sangre teniendo una vida media larga, aunque por desgracia ni la liberación ni la vida media se pudieron medir en el presente trabajo. Los resultados obtenidos en las crías, pueden aportar cierta información para explicar las diferencias observadas entre expresión de resistina y su concentración en el suero. Así, según se muestra en el exp. 3 p.70, en las

Resultados y Discusión

crías se expresó resistina en la BAT². Ésta no se relacionó con sus niveles plasmáticos (exp. 3 fig. 1 y 2 p.75 y 76), de hecho, 5 días tras el nacimiento (p.p.) los animales tuvieron una menor expresión de resistina que a día 29p.p. (tras el destete), presentando la misma concentración de la proteína en el suero. Este hecho apunta a que las madres podrían regular a través de la leche los niveles circulantes de resistina de sus crías, señal para la correcta homeostasis de la glucosa, lo que también se ha descrito en humanos (Ng *et al.*, 2005). Las crías tras el destete presentaron un aumento de expresión de la resistina, como respuesta fisiológica al descenso de los niveles de la molécula en sangre, - recordemos que cesa el aporte materno- (exp. 3 fig. 2 y 3 p.76). En las crías a partir del destete, se observó una relación directa expresión-contenido en suero de resistina, luego debe existir un factor que varía entre el adulto y la cría. A este respecto, tras el desarrollo sexual existen diferencias entre los niveles de resistina entre machos y hembras (Gui *et al.*, 2004, Sieminska *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2004), hecho que no se observó en las crías antes del desarrollo sexual (exp. 3 tabla 1 p.77). Este dato apunta a que las hormonas sexuales pueden ser responsables de la modulación de la proteína y explicar al menos en parte, las diferencias observadas en el comportamiento de la resistina en nuestro modelo de rata gestante. Con este fin, se estudiaron 4 hormonas sexuales que están implicadas en la gestación, a saber, la gonadotropina coriónica humana (hCG), la progesterona, el estradiol y la prolactina.

Según se muestra en el exp. 2 fig. 7 p.64 y exp. 4 fig. 3 p.87, la inyección con hCG aumentó la expresión de resistina en todos los depósitos de grasa analizados. Al estudiar la síntesis de resistina en los diferentes depósitos (exp. 6 fig. anexa 3 p.120), se observó un incremento en los depósitos inguinal y retroperitoneal frente a los contro-

² Sólo se midió en la BAT y no en la WAT, debido a que esta última es casi inexistente en los recién nacidos.

Resultados y Discusión

les, en el depósito parametrial existió un aumento de la síntesis aunque no se observaron diferencias significativas. Como resultado del estudio de la liberación de resistina en los depósitos tras el tratamiento con hCG (exp. 6 fig. anexa 4 p.121), no se observaron variaciones entre tratados y controles, en la grasa parametrial e inguinal, mientras que el depósito retroperitoneal liberó más resistina. Aunque el depósito retroperitoneal liberó más resistina tras el tratamiento con hCG, parece que su contribución a los niveles plasmáticos de la proteína es pequeña, ya que no se observaron cambios en la concentración de resistina en el suero de aquellos tratados con hCG frente a sus controles. A su vez, la hormona hCG aumentó significativamente los niveles de estradiol, mientras que los de progesterona permanecieron inalterados (exp. 4 p.82). Tras el tratamiento con estradiol (exp. 4 fig. 2 p.87), los depósitos parametrial e inguinal presentaron una menor expresión de resistina (estos datos concuerdan con lo publicado para ratas ovariectomizadas y ratones, -Gui *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 2005, Sieminska *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2004-). Al analizar la liberación de resistina en el tratamiento con estradiol (exp. 6 fig. anexa 2 p.119), sólo el depósito inguinal liberó menos proteína en relación con los controles. Nuevamente su contribución a la sangre no fue suficiente para que existan diferencias significativas en la concentración de resistina, aunque se observaron valores más bajos en aquellos animales tratados con estradiol que en los controles (exp. 4 table 2 p.86). Por el contrario, el tratamiento con progesterona tan sólo aumentó la expresión de resistina (3,5 veces) en el depósito retroperitoneal³ (exp. 4 fig. 1 p.86). Este hecho se relaciona con lo ocurrido en la sangre, donde la concentración de resistina aumentó significativamente en aquellos animales tratados al ser com-

³ Para los experimentos con hormonas se utilizaron diferentes depósitos de WAT. En los tratamientos con progesterona, debido a que los depósitos subcutáneos no presentaron diferencias en la expresión, equiparables a lo encontrado en los mismos depósitos subcutáneos en las ratas durante la gestación, decidimos suprimir de nuestros posteriores estudios la grasa subcutánea e incrementar un depósito más de grasa visceral, esto es la grasa inguinal. El orden de aparición de los experimentos en la presente tesis no se agrupó de manera cronológica, sino obedeciendo a criterios prácticos, de ahí que aparezca esta pequeña variación en los depósitos estudiados según el experimento del que tratemos.

Resultados y Discusión

parados con sus respectivos controles (exp. 4 table 2 p.86). Por último, la expresión de resistina se vio disminuida en todos los depósitos analizados tras un tratamiento con prolactina (exp. 6 fig. anexa 5 p.122). Aunque en la sangre la concentración de resistina también disminuyó tras el tratamiento con prolactina (exp. 6 fig. anexa 7 p.124), no existieron diferencias en la liberación de resistina por parte de los diferentes depósitos de WAT (exp. 6 fig. anexa 6 p.123). Estas observaciones no concuerdan con lo publicado en cultivos celulares (Schaffler *et al.*, 2005) donde la prolactina tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de resistina. Así, la prolactina afecta de manera independiente a la expresión de resistina en la WAT y a su concentración en el suero; la causa que se esconde detrás de esta divergencia debe ser objeto de estudios posteriores.

De todas las observaciones precedentes, en relación con los tratamientos hormonales, se desprenden algunas conclusiones de interés. En primer lugar, los datos anteriores confirman el hecho de que la expresión de resistina así como sus niveles en la sangre, pueden verse afectados al menos por las cuatro hormonas estudiadas. Todas ellas, producen efectos diferentes en cuanto a la expresión de resistina y sus concentraciones en la sangre. El efecto del estradiol y de la progesterona es diferente según el depósito que se analiza, hecho que probablemente refleje la diferente distribución de los receptores de hormonas relacionadas con la reproducción según el depósito de WAT que se considere (Mayes & Watson, 2004, Rodríguez-Cuenca *et al.*, 2005), estos datos a su vez sugieren que cada depósito de WAT puede jugar un papel diferente en la regulación de la fisiología de la resistina. De acuerdo con lo anterior, la WAT ha de ser estudiada en su conjunto ya que los datos entre depósitos pueden ser muy divergentes. Por otro lado, en la rata como en los demás mamíferos estudiados, no existen receptores específicos para la CG, sino que actúa a través de los receptores LH, conocidos como LH/CGR (Ascoli *et al.*, 2002, Costagliola *et al.*, 2005), cuyos efectos son el

Resultados y Discusión

mantenimiento del cuerpo lúteo durante la primera parte de la gestación (Freeman, 1994, Leymarie & Martal, 2001). Como resultado de la inyección de la hormona, la expresión de resistina se vio incrementada, lo que sugiere la existencia de receptores LH/CGR en la WAT, hecho no observado antes por ningún otro autor, aunque hay datos publicados de la existencia de LH/CGR en tejidos no gonadales (Rao, 2001). El efecto estimulante de la progesterona e inhibitorio del estradiol, no pueden explicar plenamente la sobre expresión de resistina al comienzo de la gestación. Por otro lado, al final de la gestación se observó una caída de los niveles de progesterona y un aumento del estradiol, lo que explicaría la disminución en la expresión de resistina por parte del tejido adiposo. A su vez, la progesterona, antes de verse disminuida hacia el final de la gestación, podría contribuir al incremento de los niveles de resistina en suero, que se da en este periodo. La prolactina que se vio incrementada en el suero al comienzo de la gestación, podría ser la candidata para explicar el descenso de los niveles plasmáticos de resistina al inicio de la misma.

Por fin, como sumario del proceso, podemos decir que el inicio de la gestación supone el aumento de LH, y de prolactina. Ambas hormonas tendrían dos efectos diferentes al comienzo de la gestación sobre la expresión y niveles plasmáticos de resistina. Por un lado, la activación de los receptores LH/CGR por parte de la LH aumentaría la expresión de resistina en la WAT (como muestran nuestros datos con hCG). La prolactina, podría ser la hormona responsable de la disminución en la sangre de la concentración de resistina. Por otro lado, hacia el final de la gestación antes de la caída de progesterona, ésta aumentaría los niveles en la sangre de resistina, mientras que el estradiol podría ser el responsable de la disminución de la expresión de resistina en al menos el depósito parametrial. Estos datos ofrecen la posibilidad de una regulación si-

Resultados y Discusión

multánea con otros factores de naturaleza diversa que puedan modular la resistencia a lo largo de la gestación.

El TNF- α y la IL-6 son otras dos adipocinas producidas en el tejido adiposo que se han relacionado con la resistencia a la insulina y con la obesidad (Fontana *et al.*, 2007, Olszanecka-Glinianowicz *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2007). Como se muestra en el exp. 5 fig. 4 p.116, el contenido en la grasa parametrial de TNF- α se vio aumentado al comienzo de la gestación y se mantuvo hasta el final de la misma. Cuando se midió la liberación por parte del depósito parametrial de la WAT (exp. 5 fig. 4 p.116), no se observaron diferencias entre las gestantes en comparación con los controles. Por otro lado, el contenido de la adipocina en la grasa subcutánea sólo se vio incrementado a día 15 de la gestación (exp. 5 fig. 4 p.116). Los niveles de la adipocina eran tan bajos que no se pudieron detectar en el suero ni en el CSF. A su vez, durante la gestación también aumentó el contenido de IL-6 en el depósito parametrial de la WAT (3,5 veces más), frente a los controles no gestantes, como se muestra en el exp. 5 fig. 1 p.113. Los depósitos subcutáneos sólo vieron aumentado su contenido en IL-6 al final de la gestación (exp. 5 fig. 2 p.114). También se midió la liberación de la adipocina en los depósitos parametrial y subcutáneo, (exp. 5 fig. 1 y 2 p.113 y 114), donde no se observó ninguna variación. Por tanto, aunque el contenido de la IL-6 se vio aumentado durante la gestación, no se libera más. Por otro lado en el suero existió un aumento de la concentración a lo largo de toda la gestación, alcanzando valores máximos (3 veces más) al final de la misma (exp. 5 fig. 3 p.115). La concentración en CSF mostró un patrón similar que en la sangre, aunque al final de la gestación cayó a valores similares a los controles no gestantes (exp. 5 fig. 3 p.115).

Resultados y Discusión

Estos datos, muestran que ambas adipocinas, es decir, IL-6 y TNF- α , se encuentran presentes en la WAT, al menos en los depósitos parametrial y subcutáneo, tanto de ratas gestantes como de sus respectivos controles no gestantes. Parece que la gestación es un estímulo suficiente como para poder aumentar la producción de estas adipocinas, particularmente en la grasa parametrial. Este hecho concuerda con lo ya publicado, al menos para IL-6, donde se determinó que la grasa visceral es más productora que la subcutánea (Fried *et al.*, 1998). La señal que puede hacer que aumenten los niveles de estas adipocinas puede ser o bien los esteroides sexuales implicados en la reproducción, o bien la sobre expresión de resistina, ya que se ha visto que existe una relación entre TNF- α , IL-6 y resistina (Guzik *et al.*, 2006, Pantsulaia *et al.*, 2007). Los incrementos de ambas adipocinas fueron independientes de la adipogénesis ocurrida en el depósito parametrial al final de la gestación, -recordemos que a comienzo de la gestación propusimos que la resistina era responsable de la inhibición de la adipogénesis, para progresivamente aumentar hacia el final de la gestación donde el peso de los depósitos viscerales es mayor que el de sus controles, (exp. 1 fig. 1 y 2 p.53)-. Luego, parece evidente que el aumento de ambas adipocinas en la WAT es independiente de la variación del peso del depósito, en otras palabras, que el depósito aumente su masa no ocurre en paralelo al aumento de IL-6 y TNF- α , cosa que no pasa con la resistina. Este dato, junto con la ausencia de diferencias en lo liberado por el tejido, apuntan a una función a nivel local de ambas adipocinas. Se sabe, que la IL-6 y el TNF- α pueden interferir con las rutas de señalización de la insulina. Este factor, es de una gran importancia en la gestación, ya que la insulina estimula la actividad lipogénica en los adipocitos, en otras palabras, se acumula grasa en los adipocitos. El incremento rápido en la WAT de IL-6 y de TNF- α , podría reducir la sensibilidad a la insulina y por tanto favorecer que los depósitos de grasa no acumulen lípidos, permaneciendo disponibles

Resultados y Discusión

para el uso de otros órganos. Esta primera respuesta, se ve observada al comienzo de la gestación cuando los depósitos de grasa se ven disminuidos en su peso. A lo largo de la gestación, se incrementa la resistencia a la insulina de tal manera que la hiperinsulinemia originaría en última instancia la acumulación de lípidos y el crecimiento del depósito. La sobre expresión de resistina, como ya se propuso, podría tener acciones a nivel local en la inhibición de la adipogénesis, luego, al inicio de la gestación, por un lado la resistina inhibiría la adipogénesis y la IL-6 y el TNF- α reducirían la sensibilidad a insulina, ya que sobre el día 8 de gestación se produjo la mayor sensibilidad a la insulina. En definitiva, como respuesta fisiológica al aumento de la sensibilidad a la insulina en la WAT, se inhibiría la adipogénesis, es decir menos células disponibles para acumular grasa y más resistentes a la insulina. Así, aumenta la hiperinsulinemia hacia el final de la gestación (Ramos *et al.*, 2003), hecho que coincide con el descenso de la expresión de resistina en la WAT. En este estadio (final de la gestación), no existe una inhibición de la adipogénesis a nivel local, implicando aumentos del tejido y una mayor acumulación de la grasa.

La IL-6 aumentó en el suero durante la gestación, lo que sugiere un aporte por parte de otro tejido diferente de la WAT. La placenta es un recurso de adipocinas que se liberan a la sangre (Benyo *et al.*, 2001, Lepercq *et al.*, 2001, Malek *et al.*, 2001) y así se pueden controlar los cambios metabólicos de las madres (Hauguel-de Mouzon & Guerre-Millo, 2006). De hecho, el TNF- α está correlacionado con la resistencia a la insulina en mujeres durante la gestación (Kirwan *et al.*, 2002). Estas adipocinas, podrían gobernar la resistencia a la insulina a nivel local pero también de manera sistémica, ya que al menos la IL-6 fue detectada en la sangre. Un órgano susceptible de sus acciones es el músculo, ya que al final de la gestación presenta resistencia a la insulina (Leturque *et al.*, 1986). Este hecho, se ve reforzado por nuestros datos de expresión de los

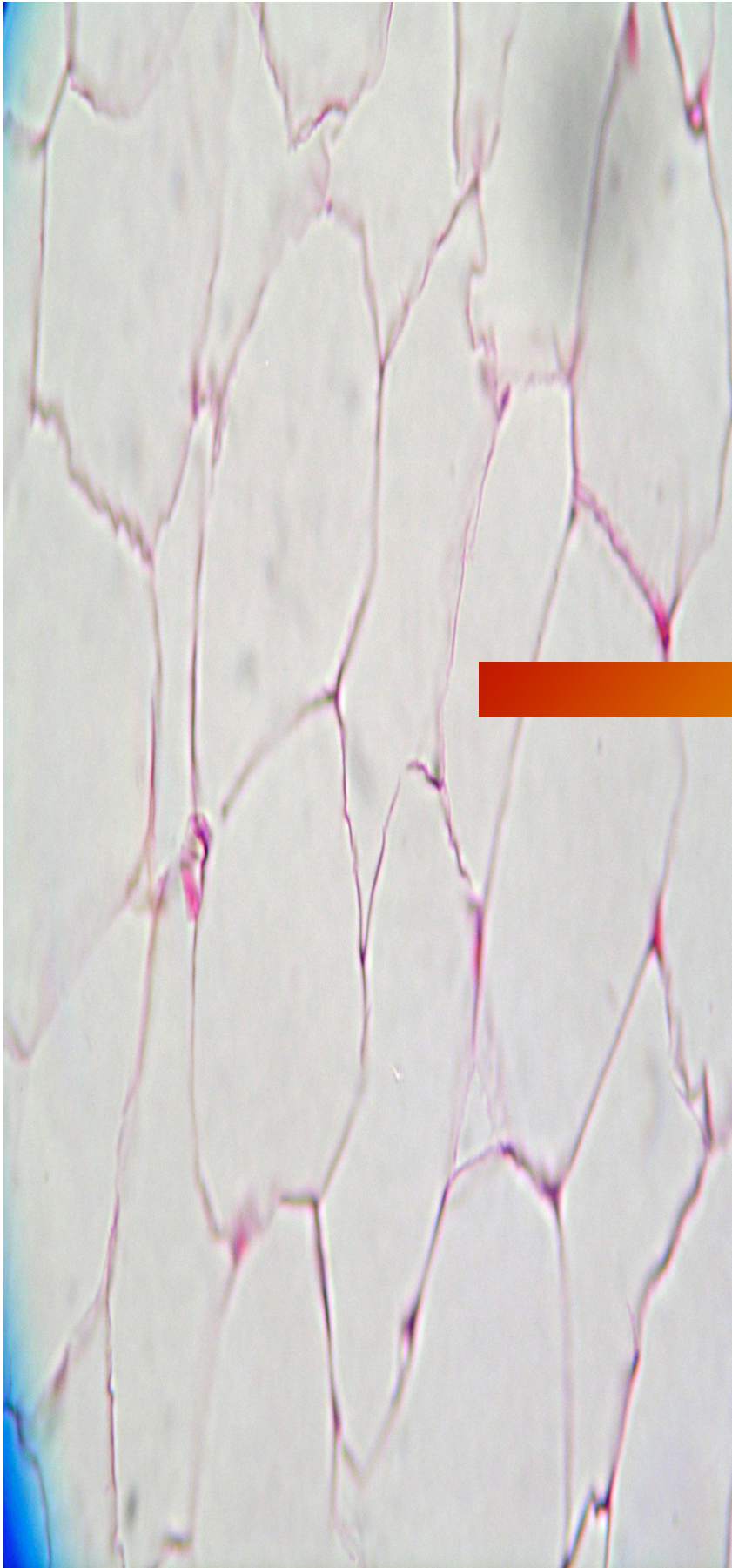
Resultados y Discusión

receptores GLUT 4 en el músculo *soleus*. Por otro lado, los niveles de IL-6 en el CSF se movieron en paralelo a los del suero en las primeras dos semanas de gestación. En la última semana, la concentración en el suero se mantuvo mientras que en el CSF disminuyó haciéndose similar a los controles. Entonces cabe preguntarse: ¿la IL-6 del CSF podría proceder de la existente en el suero?. La respuesta probablemente sea si puesto que se correlacionan las concentraciones en el suero con las existentes en el CSF. Así pues, parece que al menos durante las dos primeras semanas de gestación los niveles de IL-6 en el CSF proceden de los existentes en el suero. Y ¿qué ocurre con la última semana?. Lo que probablemente reflejan nuestros datos, es que en la última semana de gestación se produce un fenómeno de resistencia central a la IL-6, esto mismo se ha descrito para leptina en ratas gestantes, hecho que evita el efecto que tendría el aumento de leptina sobre la ingestión de alimento al final de la gestación (Ladyman & Grattan, 2004). En cualquier caso, la existencia de IL-6 en el CSF concuerda con el papel propuesto para la IL-6 en el control de la resistencia a la insulina. Así, a nivel central la IL-6 estimula la actividad simpática (Jansson *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2002, Wernstedt *et al.*, 2006), lo que aumenta la lipólisis en los adipocitos. Este fenómeno podría tener lugar en las dos primeras semanas de la gestación reduciendo la deposición de lípidos en la WAT, para después recuperar unos valores similares a los controles y así favorecer la deposición de grasa en la WAT. Parece por tanto evidente la participación del TNF- α e IL-6 en la gestación y en las variaciones de la sensibilidad-resistencia a la insulina.

En resumen, la gestación implica una serie de cambios que conllevan el incremento de la masa corporal, así como de la resistencia a la insulina, para que exista un mejor aporte de sustratos energéticos a las crías. Con este fin, los niveles de expresión de la resistina se vieron aumentados en la WAT al comienzo de la gestación, señal pro-

Resultados y Discusión

blemente capaz de inhibir la adipogénesis. La concentración plasmática de resistina durante este periodo permanece disminuida. Las hormonas sexuales podrían, junto con otros factores, modular estas variaciones en la resistina a lo largo de toda la gestación. A su vez la IL-6 y TNF- α aumentaron localmente en la WAT, como respuesta fisiológica para contrarrestar la elevada sensibilidad a la insulina que se ocasionó en la primera semana de gestación. Durante esta fase, la concentración de IL-6 va aumentando en el suero probablemente debido a la producción placentaria de la adipocina. Así, hacia el final de la gestación, la expresión de resistina se vio disminuida probablemente por acción de las hormonas sexuales, lo que permite el crecimiento de los depósitos de la WAT y por tanto la acumulación de lípidos para frenar en parte la hiperinsulinemia ocurrida. Este hecho se desarrolla en paralelo a la elevación de los niveles de resistina en el suero, probablemente inducidos por las hormonas sexuales. La elevación de IL-6 y de resistina en el suero durante este periodo de la gestación, serviría como señal para la resistencia a la insulina en músculo. Las concentraciones de IL-6 en el CSF aumentaron en paralelo a los niveles de la adipocina en sangre en las dos primeras semanas de la gestación, lo que podría afectar a la sensibilidad de la insulina en el músculo y favorecer la acción del sistema nervioso simpático sobre la lipólisis. Este efecto, tiende a desaparecer al final de la gestación por resistencia central a la IL-6.



CONCLUSIONES

Conclusiones



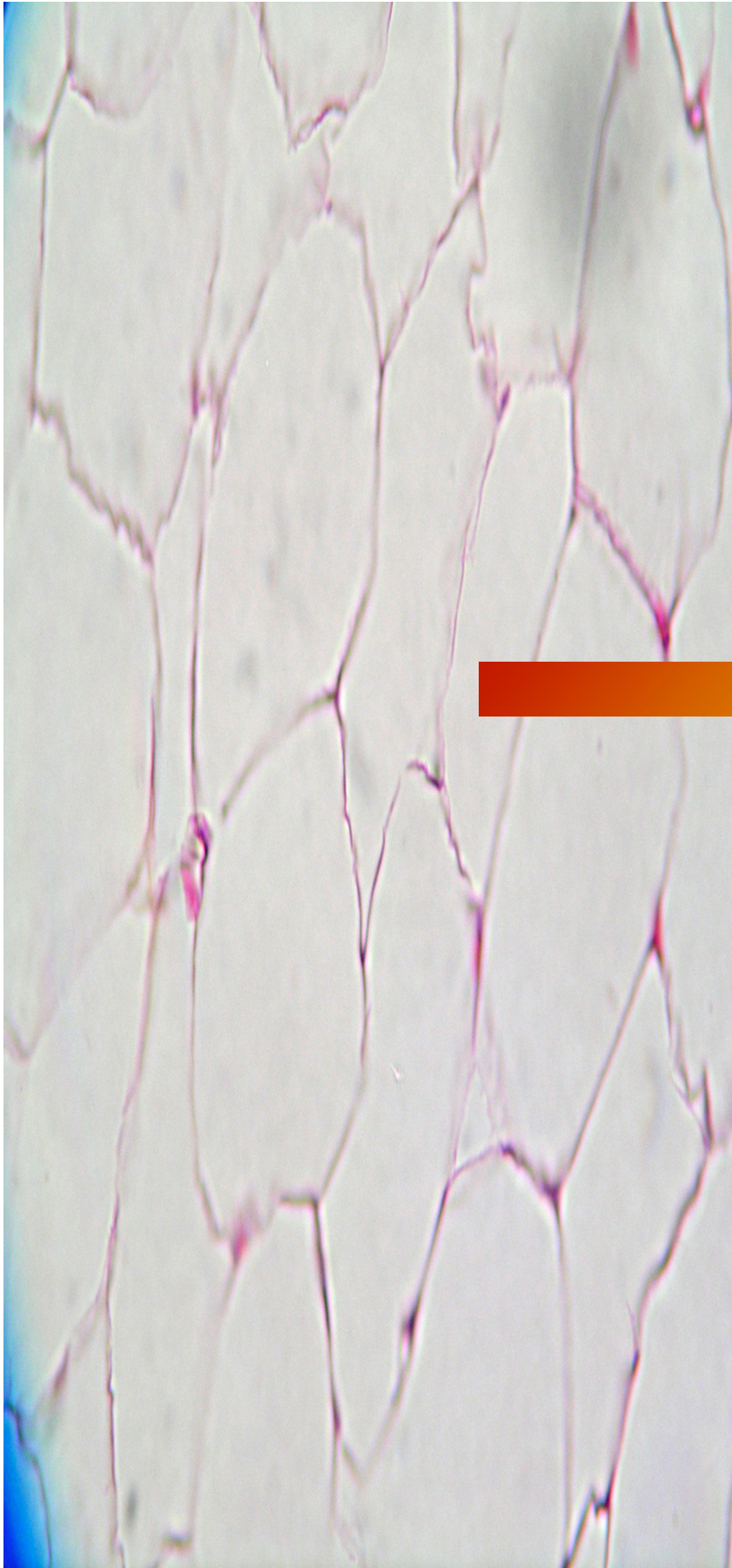
A la luz de los datos publicados hasta la fecha, así como de los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir:

1. La expresión de adiponectina en la WAT, su contenido, su liberación, así como su concentración en suero y CSF son similares entre los controles no gestantes y las ratas durante la gestación. Por tanto, la adiponectina no parece jugar un papel en el control de la sensibilidad a la insulina en la rata durante la gestación.
2. La expresión de resistina en la WAT, así como su concentración en el suero de las ratas durante la gestación y lactación varía de una manera diferencial siendo los cambios en el suero paralelos a la variación de la sensibilidad-resistencia a la insulina, lo que indica un papel de la adipocina en el control de la resistencia a la insulina durante gestación en la rata. Los cambios en la expresión sugieren un control adipogénico negativo. Las hormonas implicadas en la reproducción, están relacionadas al menos en parte con el control de su expresión y de su liberación.
3. La IL-6 y TNF- α , se encuentran aumentadas en los depósitos de la WAT. También la IL-6 se detecta en el suero y el CSF, variando sus concentraciones a lo largo de la gestación, lo que indica un papel de ambas adipocinas en la modulación de la sensibilidad-resistencia a la insulina durante la gestación en la rata.

En resumen, durante la gestación en la rata, existen cambios en las adipocinas. Algunos de esos cambios parecen tener efectos locales en los depósitos grasos controlando el metabolismo de los propios depósitos, mientras que otros se logran con efec-

Conclusiones

tos sistémicos y centrales, aunque el origen de las adipocinas no necesariamente sea la WAT.



BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía



Abelenda M & Puerta ML 1987 Inhibition of diet-induced thermogenesis during pregnancy in the rat. *Pflugers Arch* 409 314-317.

Abizaid A, Gao Q & Horvath TL 2006 Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron* 51 691-702.

Allender S & Rayner M 2007 The burden of overweight and obesity-related ill health in the UK. *Obes Rev* 8 467-473.

Altomonte J, Harbaran S, Richter A & Dong H 2003 Fat depot-specific expression of adiponectin is impaired in Zucker fatty rats. *Metabolism* 52 958-963.

Andrews JF, Richard D, Jennings G & Trayhurn P 1986 Brown adipose tissue thermogenesis during pregnancy in mice. *Ann Nutr Metab* 30 87-93.

Anghel SI, Bedu E, Delucinge Vivier C, Descombes P, Desvergne B & Wahli W 2007 Adipose tissue integrity as a prerequisite for systemic energy balance : A critical role for PPARgamma. *J Biol Chem*.

Anthonsen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E & Holm C 1998 Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem* 273 215-221.

Aquila H, Misra D, Eulitz M & Klingenberg M 1982 Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef heart mitochondria. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363 345-349.

Archanco M, Gomez-Ambrosi J, Tena-Sempere M, Fruhbeck G & Burrell MA 2007 Expression of Leptin and Adiponectin in the Rat Oviduct. *J Histochem Cytochem*.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M et al. 2002 Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105 2893-2898.

Bibliografía

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K et al. 1999a Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257 79-83.

Arner P 1997 Regional adiposity in man. *J Endocrinol* 155 191-192.

Arora S & Anubhuti 2006 Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides* 40 375-401.

Ascoli M, Fanelli F & Segaloff DL 2002 The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23 141-174.

Asensio C, Cettour-Rose P, Theander-Carrillo C, Rohner-Jeanrenaud F & Muzzin P 2004 Changes in glycemia by leptin administration or high-fat feeding in rodent models of obesity/type 2 diabetes suggest a link between resistin expression and control of glucose homeostasis. *Endocrinology* 145 2206-2213.

Badman MK & Flier JS 2005 The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 307 1909-1914.

Baker AR, Silva NF, Quinn DW, Harte AL, Pagano D, Bonser RS, Kumar S & McTernan PG 2006 Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 5 1.

Ballantyne B 1968 Histochemical and biochemical aspects of cholinesterase activity of adipose tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 173 343-350.

Banerjee RR & Lazar MA 2001 Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* 276 25970-25973.

Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE et al. 2004 Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303 1195-1198.

Bartness TJ & Song CK 2007 Brain-adipose tissue neural crosstalk. *Physiol Behav* 91 343-351.

Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H & Hainque B 2000 Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85 3338-3342.

Bibliografía

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J & Feve B 2006 Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17 4-12.

Bell AW & Bauman DE 1997 Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2 265-278.

Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C & Conrad KP 2001 Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 86 2505-2512.

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

Berthoud HR 2006 Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5 197S-200S.

Bertile F & Raclot T 2004 Differences in mRNA expression of adipocyte-derived factors in response to fasting, refeeding and leptin. *Biochim Biophys Acta* 1683 101-109.

Bing C, Gomez-Ambrosi J, Zabalegui N, Williams G & Trayhurn P 2002 Resistin and RELM-alpha gene expression in white adipose tissue of lactating mice. *Biochem Biophys Res Commun* 296 458-462.

Bjorbaek C & Kahn BB 2004 Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59 305-331.

Bonora E, Moghetti P, Zaccanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A & Muggeo M 1989 Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 68 374-378.

Borst SE, Conover CF & Bagby GJ 2005 Association of resistin with visceral fat and muscle insulin resistance. *Cytokine* 32 39-44.

Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P & Giacobino JP 1997 Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408 39-42.

Bouillaud F, Weissenbach J & Ricquier D 1986 Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J Biol Chem* 261 1487-1490.

Bibliografía

Bouillaud F, Raimbault S & Ricquier D 1988 The gene for rat uncoupling protein: complete sequence, structure of primary transcript and evolutionary relationship between exons. *Biochem Biophys Res Commun* 157 783-792.

Bouillaud F, Ricquier D, Thibault J & Weissenbach J 1985 Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 445-448.

Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T & Cao Y 2004 Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 2476-2481.

Brown JE, Onyango DJ & Dunmore SJ 2007 Resistin down-regulates insulin receptor expression, and modulates cell viability in rodent pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 581 3273-3276.

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

Bub JD, Miyazaki T & Iwamoto Y 2006 Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340 1158-1166.

Caja S & Puerta M 2007 Control by reproduction-related hormones of resistin expression and plasma concentration. *Horm Metab Res* 39 501-506.

Caja S, Martinez I, Abelenda M & Puerta M 2005 Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats. *J Endocrinol* 185 551-559.

Caja S, Torrente M, Martinez I, Abelenda M & Puerta M 2005 Adiponectin values are unchanged during pregnancy in rats. *J Endocrinol Invest* 28 609-615.

Calabro P & Yeh ET 2007 Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem* 42 63-91.

Cannon B & Nedergaard J 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84 277-359.

Cannon B, Shabalina IG, Kramarova TV, Petrovic N & Nedergaard J 2006 Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not? *Biochim Biophys Acta* 1757 449-458.

Bibliografía

Capeau J 2007 The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: To follow. *J Hepatol*.

Carroll AM, Haines LR, Pearson TW, Fallon PG, Walsh CM, Brennan CM, Breen EP & Porter RK 2005 Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus. *J Biol Chem* 280 15534-15543.

Carvalho E, Kotani K, Peroni OD & Kahn BB 2005 Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289 E551-561.

Cassard AM, Bouillaud F, Mattei MG, Hentz E, Raimbault S, Thomas M & Ricquier D 1990 Human uncoupling protein gene: structure, comparison with rat gene, and assignment to the long arm of chromosome 4. *J Cell Biochem* 43 255-264.

Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston-Presley L, Bernard S, Kalhan S & Hauguel-De Mouzon S 2006 Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*.

Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M & Ghenev PI 2003 Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr Pharm Des* 9 1023-1031.

Chen L & Nyomba BL 2003 Glucose intolerance and resistin expression in rat offspring exposed to ethanol in utero: modulation by postnatal high-fat diet. *Endocrinology* 144 500-508.

Chen YC, Tsai EM, Chen HS, Liu YH, Lee CH, Chou FH, Chen IJ, Chen SY, Jong SB & Chan TF 2007 Serum resistin level is a predictor of ovarian response in in vitro fertilisation cycle. *Acta Obstet Gynecol Scand* 86 963-967.

Chen YH, Lee MJ, Chang HH, Hung PF & Kao YH 2006 17 beta-estradiol stimulates resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes via the estrogen receptor, extracellularly regulated kinase, and CCAAT/enhancer binding protein-alpha pathways. *Endocrinology* 147 4496-4504.

Chern BY, Chen YH, Hong LS & Lapolt PS 2000 Ovarian steroidogenic responsiveness to exogenous gonadotropin stimulation in young and middle-aged female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 224 285-291.

Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162 156-159.

Bibliografía

Cinti S 2006 The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 569-574.

Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD & Kahn SE 2003 Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46 459-469.

Coll AP, Farooqi IS & O'Rahilly S 2007 The hormonal control of food intake. *Cell* 129 251-262.

Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS & Scherer PE 2003 Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52 268-276.

Coppack SW 2001 Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 60 349-356.

Coppola A & Diano S 2007 Hormonal regulation of the arcuate nucleus melanocortin system. *Front Biosci* 12 3519-3530.

Costagliola S, Urizar E, Mendive F & Vassart G 2005 Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors. *Reproduction* 130 275-281.

Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R & Bouloumie A 2006 Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 49 744-747.

Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Hirata A, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Tominaga M & Kato T 2003 Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study. *Diabetes Care* 26 2015-2020.

Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M, Ghatei MA & Bloom SR 2004 Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology* 145 2687-2695.

Das K, Lin Y, Widen E, Zhang Y & Scherer PE 2001 Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30. *Biochem Biophys Res Commun* 280 1120-1129.

Bibliografía

De Assis S, Wang M, Goel S, Foxworth A, Helferich W & Hilakivi-Clarke L 2006 Excessive weight gain during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley and lean and obese Zucker rats. *J Nutr* 136 998-1004.

De Vriese C & Delporte C 2007 Influence of ghrelin on food intake and energy homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10 615-619.

DiMascio L, Voermans C, Uqoezwa M, Duncan A, Lu D, Wu J, Sankar U & Reya T 2007 Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J Immunol* 178 3511-3520.

Douglas AJ, Johnstone LE & Leng G 2007 Neuroendocrine mechanisms of change in food intake during pregnancy: a potential role for brain oxytocin. *Physiol Behav* 91 352-365.

Duval C, Camara Y, Hondares E, Sibille B & Villarroya F 2007 Overexpression of mitochondrial uncoupling protein-3 does not decrease production of the reactive oxygen species, elevated by palmitate in skeletal muscle cells. *FEBS Lett* 581 955-961.

Echtay KS & Brand MD 2007 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *Redox Rep* 12 26-29.

Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ et al. 2003 A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* 22 4103-4110.

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S et al. 2002 Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415 96-99.

Erskine MS, Lehmann ML, Cameron NM & Polston EK 2004 Co-regulation of female sexual behavior and pregnancy induction: an exploratory synthesis. *Behav Brain Res* 153 295-315.

Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW & Lloyd Hiler M 2003 Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 300 674-678.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P & Bahouth SW 2004 Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145 2273-2282.

Bibliografía

Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J & Paschke R 2003 Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301 1045-1050.

Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R & Friedman JM 1997 Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 7001-7005.

Festuccia WT, Laplante M, Berthiaume M, Gelinat Y & Deshaies Y 2006 PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* 49 2427-2436.

Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D et al. 1997 Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15 269-272.

Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE & Klein S 2007 Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56 1010-1013.

Freeman KB, Meyrick K, Patel HV & Ridley RG 1985 Size analysis of uncoupling protein and its precursor from brown adipose tissue of different species. *Can J Biochem Cell Biol* 63 988-991.

Freeman M 1994 The neuroendocrine control of the ovarian cycle in the rat. In *The physiology of reproduction*, pp 613-658, edn. Ed. Eds E Knobil & J Neil. New York: Prentice Hall.

Freeman ME 1979 A direct effect of the uterus on the surges of prolactin induced by cervical stimulation in the rat. *Endocrinology* 105 387-390.

Freemark M, Kirk K, Pihoker C, Robertson MC, Shiu RP & Driscoll P 1993 Pregnancy lactogens in the rat conceptus and fetus: circulating levels, distribution of binding, and expression of receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 133 1830-1842.

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

Friedman JM 1999 Leptin and the regulation of body weight. *Harvey Lect* 95 107-136.

Bibliografía

Friedman JM 2002 The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 60 S1-14; discussion S68-84, 85-17.

Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ & Burrell AM 2001 The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol* 280 E827-E847.

Fujita H, Fujishima H, Morii T, Koshimura J, Narita T, Takei M & Ito S 2002 Effect of metformin on adipose tissue resistin expression in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 298 345-349.

Garcia MC, Wernstedt I, Berndtsson A, Enge M, Bell M, Hultgren O, Horn M, Ahren B, Enerback S, Ohlsson C et al. 2006 Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor 1 knockout mice. *Diabetes* 55 1205-1213.

Garg A 2006 Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clin Cornerstone* 8 Suppl 4 S7-S13.

Garg M, Thamocharan M, Rogers L, Bassilian S, Lee WN & Devaskar SU 2006 Glucose metabolic adaptations in the intrauterine growth-restricted adult female rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 E1218-1226.

Ghosh S, Misro M, Das UB, Maiti R, Debnath JM & Ghosh D 2001 Effect of human chorionic gonadotrophin coadministration on ovarian steroidogenic and folliculogenic activities in cyclophosphamide treated albino rats. *Reprod Toxicol* 15 221-225.

Giordano A, Song CK, Bowers RR, Ehlen JC, Frontini A, Cinti S & Bartness TJ 2006 White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291 R1243-1255.

Giorgino F, Laviola L & Eriksson JW 2005 Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand* 183 13-30.

Golozoubova V, Hohtola E, Matthias A, Jacobsson A, Cannon B & Nedergaard J 2001 Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *Faseb J* 15 2048-2050.

Gomez-Ambrosi J, Zabalegui N, Bing C, Tisdale MJ, Trayhurn P & Williams G 2002 Weight loss in tumour-bearing mice is not associated with changes in resistin gene expression in white adipose tissue. *Horm Metab Res* 34 674-677.

Bibliografía

González C, Fernández Diaz BB, Fernández S & Patterson AM 1998 Pregnancy in rats and food restriction (50%): insulin response in relation to serum lipids and lipoprotein levels. *Nutrition Research* 18 1235-1244.

Goralski KB & Sinal CJ 2007 Type 2 diabetes and cardiovascular disease: getting to the fat of the matter. *Can J Physiol Pharmacol* 85 113-132.

Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO & Jablons D 1992 Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res* 52 4113-4116.

Grueso E, Rocha M & Puerta M 2001 Plasma and cerebrospinal fluid leptin levels are maintained despite enhanced food intake in progesterone-treated rats. *European Journal of Endocrinology* 144 659-665.

Gu N, Guo XR, Ni YH, Liu F, Fei L & Chen RH 2007 [Overexpression of resistin affect 3T3-L1 adipocyte lipid metabolism]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 24 251-255.

Guerre-Millo M 2004 Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 30 13-19.

Gui Y, Silha JV & Murphy LJ 2004 Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res* 12 1481-1491.

Guzik TJ, Mangalat D & Korbut R 2006 Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* 57 505-528.

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

Halford JC & Blundell JE 2000 Pharmacology of appetite suppression. *Prog Drug Res* 54 25-58.

Hansen JB & Kristiansen K 2006 Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J* 398 153-168.

Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M & Shimazu T 1999 Role of sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* 48 1706-1712.

Bibliografía

Haugen F, Jorgensen A, Drevon CA & Trayhurn P 2001 Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters* 507 105-108.

Hauguel-de Mouzon S & Guerre-Millo M 2006 The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta* 27 794-798.

Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp A, Jr. & Nicholls DG 1978 Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem* 82 515-521.

Heilbronn L, Smith SR & Ravussin E 2004 Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4 S12-21.

Henderson LP, Penatti CA, Jones BL, Yang P & Clark AS 2006 Anabolic androgenic steroids and forebrain GABAergic transmission. *Neuroscience* 138 793-799.

Herrera E, Lasuncion MA, Huerta L & Martin-Hidalgo A 2000 Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biol Neonate* 78 315-320.

Herrera E, Lasuncion MA, Palacin M, Zorzano A & Bonet B 1991 Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* 40 Suppl 2 83-88.

Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ et al. 2000 FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *Embo J* 19 4046-4055.

Hotamisligil GS, Shargill NS & Spiegelman BM 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259 87-91.

Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC & Matsuzawa Y 2001 Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50 1126-1133.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K et al. 2000 Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 1595-1599.

Bibliografía

Hu E, Liang P & Spiegelman BM 1996 AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271 10697-10703.

Huang SW, Seow KM, Ho LT, Chien Y, Chung DY, Chang CL, Lai YH, Hwang JL & Juan CC 2005 Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 579 449-454.

Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K & Silvennoinen O 1995 Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13 369-398.

Im SS, Kwon SK, Kim TH, Kim HI & Ahn YH 2007 Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life* 59 134-145.

Jacobsson A, Stadler U, Glotzer MA & Kozak LP 1985 Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. *J Biol Chem* 260 16250-16254.

Jansson JO, Wallenius K, Wernstedt I, Ohlsson C, Dickson SL & Wallenius V 2003 On the site and mechanism of action of the anti-obesity effects of interleukin-6. *Growth Horm IGF Res* 13 Suppl A S28-32.

Jellema A, Plat J & Mensink RP 2004 Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur J Clin Invest* 34 766-773.

Josephs T, Waugh H, Kokay I, Grattan D & Thompson M 2007 Fasting-induced adipose factor identified as a key adipokine that is up-regulated in white adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *J Endocrinol* 194 305-312.

Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF & Ho LT 2001 Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 289 1328-1333.

Jung HS, Park KH, Cho YM, Chung SS, Cho HJ, Cho SY, Kim SJ, Kim SY, Lee HK & Park KS 2006 Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 69 76-85.

Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, Kim SM, Lee SY, Ahn SM, Kim YK et al. 2007 Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J Nutr Biochem*.

Bibliografía

Kageyama H, Osaka T, Kageyama A, Kawada T, Hirano T, Oka J, Miura M, Namba Y, Ricquier D, Shioda S et al. 2003 Fasting increases gene expressions of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in brown adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats. *Life Sci* 72 3035-3046.

Kahn BB 1996 Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 45 1644-1654.

Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, Polychronaki M, Voudouri T & Kouroumalis EA 2006 Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 12 100-105.

Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, Murata K, Takarada Y, Ito K, Fujii M, Tsuchihashi K, Goto H, Nakatani K et al. 1998 Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83 859-862.

Kersten S 2001 Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2 282-286.

Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G et al. 2007 Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*.

Kim KH, Lee K, Moon YS & Sul HS 2001 A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 276 11252-11256.

Kim KH, Zhao L, Moon Y, Kang C & Sul HS 2004 Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor (ADSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 6780-6785.

Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC & Catalano PM 2002 TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 51 2207-2213.

Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F & Ricquier D 1991 The uncoupling protein UCP: a membrane mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int J Biochem* 23 791-801.

Komatsu T, Itoh F, Mikawa S & Hodate K 2003 Gene expression of resistin in adipose tissue and mammary gland of lactating and non-lactating cows. *J Endocrinol* 178 R1-5.

Bibliografía

Kondo E, Sugiyama T, Kusaka H & Toyoda N 2004 Adiponectin mRNA levels in parametrial adipose tissue and serum adiponectin levels are reduced in mice during late pregnancy. *Hormone and Metabolic Research* 36 465-469.

Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, Wang Z, Sato Y, Mori N & Yamashita H 2005 UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 4 147-155.

Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T & Brzozowski T 2004 Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol* 55 137-154.

Kos K, Harte AL, da Silva NF, Tonchev A, Chaldakov G, James S, Snead DR, Hoggart B, O'Hare JP, McTernan PG et al. 2007 Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 92 1129-1136.

Kowalska I, Strackowski M, Nikolajuk A, Kinalska I, Gorska M, Prokop J, Bachorzewska-Gajewska H & Musial W 2006 Plasma adiponectin and E-selectin concentrations in patients with coronary heart disease and newly diagnosed disturbances of glucose metabolism. *Adv Med Sci* 51 94-97.

Kozak LP, Britton JH, Kozak UC & Wells JM 1988 The mitochondrial uncoupling protein gene. Correlation of exon structure to transmembrane domains. *J Biol Chem* 263 12274-12277.

Krakoff J, Funahashi T, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Tanaka S, Matsuzawa Y, Kobes S, Tataranni PA, Hanson RL, Knowler WC et al. 2003 Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian. *Diabetes Care* 26 1745-1751.

Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, Van Heijningen CL, Sluiter AA, Mettenleiter TC, Romijn JA et al. 2002 Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat-functional implications. *J Clin Invest* 110 1243-1250.

Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H et al. 2002 Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277 25863-25866.

Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, Kumagai H, Itoh S, Satoh H, Yano W, Ogata H, Tokuyama K, Takamoto I et al. 2006 Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 281 8748-8755.

Bibliografía

Kusminski CM, McTernan PG & Kumar S 2005 Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 109 243-256.

Kusminski CM, da Silva NF, Creely SJ, Fisher FM, Harte AL, Baker AR, Kumar S & McTernan PG 2007 The in vitro effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 92 270-276.

Ladyman SR & Grattan DR 2004 Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* 145 3704-3711.

Laplante M, Festuccia WT, Soucy G, Gelinás Y, Lalonde J & Deshaies Y 2007 Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPAR γ agonism in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292 R1408-1417.

Lappas M, Yee K, Permezel M & Rice GE 2005 Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol* 186 457-465.

Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH & Garvey WT 2007 Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 18 263-270.

Le Lay S, Boucher J, Rey A, Castan-Laurell I, Krief S, Ferre P, Valet P & Dugail I 2001 Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 289 564-567.

Lee JH, Bullen JW, Jr., Stoyneva VL & Mantzoros CS 2005 Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 E625-632.

Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X & Rao CV 2001 Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 15 184-200.

Lenton EA, Grudzinskas GJ, Neal LM, Chard T & Cooke ID 1981 Chorionic gonadotropin concentration in early human pregnancy: comparison of specific and nonspecific assays. *Fertil Steril* 35 40-45.

Bibliografía

Lepercq J, Challier JC, Guerre-Millo M, Cauzac M, Vidal H & Hauguel-de Mouzon S 2001 Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 86 2409-2413.

Leturque A, Hauguel S, Ferre P & Girard J 1987 Glucose metabolism in pregnancy. *Biol Neonate* 51 64-69.

Leturque A, Ferre P, Burnol AF, Kande J, Maulard P & Girard J 1986 Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* 35 172-177.

Leymarie P & Martal J 2001 Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif. In *Le re-production chez les mammifères et l'home*, edn. Ed. Eds C Thibault & M Levasseur. Paris: INRA Editions.

Li G, Klein RL, Matheny M, King MA, Meyer EM & Scarpace PJ 2002a Induction of uncoupling protein 1 by central interleukin-6 gene delivery is dependent on sympathetic innervation of brown adipose tissue and underlies one mechanism of body weight reduction in rats. *Neuroscience* 115 879-889.

Li J, Yu X, Pan W & Unger RH 2002b Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282 E1334-1341.

Li L, Yang G, Li Q, Tang Y & Li K 2006 High-fat- and lipid-induced insulin resistance in rats: the comparison of glucose metabolism, plasma resistin and adiponectin levels. *Ann Nutr Metab* 50 499-505.

Lin CS & Klingenberg M 1980 Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett* 113 299-303.

Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC & Krakoff J 2002 Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 360 57-58.

Lindsay RS, Funahashi T, Krakoff J, Matsuzawa Y, Tanaka S, Kobes S, Bennett PH, Tataranni PA, Knowler WC & Hanson RL 2003 Genome-wide linkage analysis of serum adiponectin in the Pima Indian population. *Diabetes* 52 2419-2425.

Liu HS, Chen YH, Hung PF & Kao YH 2006 Inhibitory effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends on the ERK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 E273-281.

Bibliografía

Lopez M, Tovar S, Vazquez MJ, Williams LM & Dieguez C 2007 Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 66 131-155.

Lopez-Luna P, Maier I & Herrera E 1991 Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol Neonate* 60 29-38.

Lu C-C, Tsai S-C, Wang S-W, Tsai C-L, Lau C-P, Shih H-C, Chen Y-H, Chiao Y-C, Liaw C & Wang PS 1998 Effects of ovarian steroid hormones and thyroxine on calcitonin secretion in pregnant rats. *American Journal of Physiology* 274 E246-E252.

Lundbaek K 1962 Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* 5291 1507-1513.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y & Matsubara K 1996 cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221 286-289.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N et al. 2001 PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50 2094-2099.

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y et al. 2002 Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8 731-737.

Makkonen J, Westerbacka J, Kolak M, Sutinen J, Corner A, Hamsten A, Fisher RM & Yki-Jarvinen H 2007 Increased expression of the macrophage markers and of 11beta-HSD-1 in subcutaneous adipose tissue, but not in cultured monocyte-derived macrophages, is associated with liver fat in human obesity. *Int J Obes (Lond)*.

Malek A, Sager R & Schneider H 2001 Effect of hypoxia, oxidative stress and lipopolysaccharides on the release of prostaglandins and cytokines from human term placental explants. *Placenta* 22 Suppl A S45-50.

Mantzoros CS, Trakatelli M, Gogas H, Dessypris N, Stratigos A, Chrousos GP & Petridou ET 2007 Circulating adiponectin levels in relation to melanoma: a case-control study. *Eur J Cancer* 43 1430-1436.

Martins C, Morgan LM, Bloom SR & Robertson MD 2007 Effects of exercise on gut peptides, energy intake and appetite. *J Endocrinol* 193 251-258.

Bibliografía

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T et al. 1997 Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3 1029-1033.

Matsuhisa M, Yamasaki Y, Emoto M, Shimabukuro M, Funahashi T & Matsuzawa Y 2007 A novel index of insulin resistance determined from the homeostasis model assessment index and adiponectin levels in Japanese subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 77 151-154.

Mayes JS & Watson GH 2004 Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 5 197-216.

McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH & Kumar S 2002 Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 87 2407.

Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G & Vettor R 2002 Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* 10 1095-1103.

Minn AH, Patterson NB, Pack S, Hoffmann SC, Gavrilova O, Vinson C, Harlan DM & Shalev A 2003 Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 310 641-645.

Mohamed-Ali V, Pinkney JH & Coppack SW 1998 Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22 1145-1158.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S & Coppack SW 1997 Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82 4196-4200.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS & Marks JS 2003 Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *Jama* 289 76-79.

Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y & Furlanetto RW 2001 Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 276 25889-25893.

Moore GBT, Chapman H, Holder JC, Lister CA, Piercy V, Smith SA & Clapham JC 2001 Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochemical Biophysical Research Communications* 286 735-741.

Bibliografía

Morash BA, Ur E, Wiesner G, Roy J & Wilkinson M 2004 Pituitary resistin gene expression: effects of age, gender and obesity. *Neuroendocrinology* 79 149-156.

Moura AS, Franco de Sa CC, Lopez da Costa C, Vicente LL, Guerreiro SM & Pinto AM 2002 Association between nutrition and gender during lactation influencing glucose homeostasis and blood pressure of the adult offspring. *Biol Neonate* 82 263-270.

Mozo J, Emre Y, Bouillaud F, Ricquier D & Criscuolo F 2005 Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds? *Biosci Rep* 25 227-249.

Muse ED, Lam TK, Scherer PE & Rossetti L 2007 Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 117 1670-1678.

Muurahainen N, Kissileff HR, Derogatis AJ & Pi-Sunyer FX 1988 Effects of cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) on food intake and gastric emptying in man. *Physiol Behav* 44 645-649.

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

Nakata M, Okada T, Ozawa K & Yada T 2007 Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem Biophys Res Commun* 353 1046-1051.

Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H et al. 2006 Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 281 2654-2660.

Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A & Cannon B 2001 UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504 82-106.

Nedergaard J, Bengtsson T & Cannon B 2007 Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293 E444-452.

Nelson D & Cox M 2005 *Lehninger principles of biochemistry*, p. pp Pages, edn fourth edition. Ed. Eds New York: W.H. Freeman.

Neumeier M, Weigert J, Buettner R, Wanninger J, Schaffler A, Mueller AM, Killian S, Sauerbruch S, Schlachetzki F, Steinbrecher A et al. 2007 Detection of Adiponectin in Cerebrospinal Fluid in Humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

Bibliografía

Ng PC, Lee CH, Lam CW, Chan IH, Wong E & Fok TF 2005 Resistin in preterm and term newborns: relation to anthropometry, leptin, and insulin. *Pediatr Res* 58 725-730.

Nibbelink M, Moulin K, Arnaud E, Duval C, Penicaud L & Casteilla L 2001 Brown fat UCP1 is specifically expressed in uterine longitudinal smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276 47291-47295.

Nicholls DG & Locke RM 1984 Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64 1-64.

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK & McIntush EW 2000 Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80 1-29.

Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF & Dieguez C 2003a Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res* 11 408-414.

Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF & Dieguez C 2003b Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett* 548 21-27.

Nohira T, Nagao K, Kameyama K, Nakai H, Fukumine N, Okabe K, Kitano S & Hisatomi H 2004 Identification of an alternative splicing transcript for the resistin gene and distribution of its mRNA in human tissue. *Eur J Endocrinol* 151 151-154.

Oberkofler H, Dallinger G, Liu YM, Hell E, Krempler F & Patsch W 1997 Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res* 38 2125-2133.

Obici S, Feng Z, Karkanas G, Baskin DG & Rosetti L 2002 Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature Neurosciences* 5 566-572.

Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M & Taylor R 1996 Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45 881-885.

Ohya M, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Kawasaki Y, Nagasaka S, Kuroe A, Taki Y, Yoshii S, Hosokawa M et al. 2005 Three measures of tumor necrosis factor alpha activity and insulin resistance in nonobese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* 54 1297-1301.

Bibliografía

Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y & Libby P 2006 Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 110 267-278.

Okuno S, Maeda Y, Yamaguchi Y, Takao Y, Trocino RA, Takino H, Kawasaki E, Yokota A, Uotani S, Akazawa S et al. 1993 Expression of GLUT4 glucose transporter mRNA and protein in skeletal muscle and adipose tissue from rats in late pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 191 405-412.

Oliver P, Pico C, Serra F & Palou A 2003 Resistin expression in different adipose tissue depots during rat development. *Mol Cell Biochem* 252 397-400.

Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Zurakowski A & Glinianowicz M 2005 [The role of tumor necrosis factor (TNF-alpha) in control of metabolism]. *Wiad Lek* 58 670-674.

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

Palanivel R, Maida A, Liu Y & Sweeney G 2006 Regulation of insulin signalling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. *Diabetologia* 49 183-190.

Pan W & Kastin AJ 2007 Adipokines and the blood-brain barrier. *Peptides* 28 1317-1330.

Pantsulaia I, Livshits G, Trofimov S & Kobylansky E 2007 Genetic and environmental determinants of circulating resistin level in a community-based sample. *Eur J Endocrinol* 156 129-135.

Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH & Smith SA 2003 Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300 472-476.

Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE & Shapiro L 2004 Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 304 1154-1158.

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

Bibliografía

Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF & Spiegelman BM 1996 Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 271 13018-13022.

Perez-Rodrigo C, Aranceta Bartrina J, Serra Majem L, Moreno B & Delgado Rubio A 2006 Epidemiology of obesity in Spain. Dietary guidelines and strategies for prevention. *Int J Vitam Nutr Res* 76 163-171.

Perez-Tilve D, Nogueiras R, Mallo F, Benoit SC & Tschoep M 2006 Gut hormones ghrelin, PYY, and GLP-1 in the regulation of energy balance [corrected] and metabolism. *Endocrine* 29 61-71.

Petruzzelli M, Lo Sasso G, Portincasa P, Palasciano G & Moschetta A 2007 Targeting the liver in the metabolic syndrome: evidence from animal models. *Curr Pharm Des* 13 2199-2207.

Pfaff DW & Sakuma Y 1979 Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 288 189-202.

Pineiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Dieguez C, Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR & Lago F 2005 Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* 579 5163-5169.

Pocock G & Richards C 2004 human Physiology. The basis of medicine, p. ^pp Pages, edn second edition. Ed. ^Eds: Oxford University Press.

Puerta M 1996 El tejido adiposo pardo *Investigación y Ciencia* 240 15-20

Puerta M, Abelenda M, Rocha M & Trayhurn P 2002 Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissues. *Horm Metab Res* 34 629-634.

Rajala MW, Obici S, Scherer PE & Rossetti L 2003 Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111 225-230.

Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE & Ahima RS 2004 Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53 1671-1679.

Ramos MP, Crespo-Solans MD, del Campo S, Cacho J & Herrera E 2003 Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285 E318-328.

Síntesis, liberación y concentraciones de adipocinas en la rata a lo largo de la gestación. Su modulación por las hormonas implicadas en la reproducción. 165

Bibliografía

Ramsay JE, Jamieson N, Greer IA & Sattar N 2003 Paradoxical elevation in adiponectin concentrations in women with preeclampsia. *Hypertension* 42 891-894.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN & Newsholme EA 1963 The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1 785-789.

Rao CV 2001 Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertil Steril* 76 1097-1100.

Rebuffe-Scrive M, Andersson B, Olbe L & Bjorntorp P 1989 Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. *Metabolism* 38 453-458.

Remesar X, Rafecas I, Fernandez-Lopez JA & Alemany M 1997 Is leptin an insulin counter-regulatory hormone? *FEBS Lett* 402 9-11.

Ricquier D & Kader JC 1976 Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun* 73 577-583.

Rocha M, Grueso E & Puerta M 2001 The anorectic effect of oestradiol does not involve changes in plasma and cerebrospinal fluid leptin concentrations in the rat. *Journal of Endocrinology* 171 349-354.

Rocha M, Bing C, Williams G & Puerta M 2003 Pregnancy-induced hyperphagia is associated with increased gene expression of hypothalamic agouti-related peptide in rats. *Regul Pept* 114 159-165.

Rocha M, Bing C, Williams G & Puerta M 2004 Physiologic estradiol levels enhance hypothalamic expression of the long form of the leptin receptor in intact rats. *J Nutr Biochem* 15 328-334.

Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J & Fruhbeck G 2007 Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome? *Curr Pharm Des* 13 2169-2175.

Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM & Roca P 2005 Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 E200-207.

Ronti T, Lupattelli G & Mannarino E 2006 The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64 355-365.

Bibliografía

Rosen ED & MacDougald OA 2006 Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 885-896.

Rosen ED & Spiegelman BM 2006 Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444 847-853.

Ruan H, Hacoheh N, Golub TR, Van Parijs L & Lodish HF 2002 Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 51 1319-1336.

Ryan EA 2003 Hormones and insulin resistance during pregnancy. *Lancet* 362 1777-1778.

Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H et al. 2002 Role of leptin in pregnancy--a review. *Placenta* 23 Suppl A S80-86.

Salani B, Briatore L, Andraghetti G, Adami GF, Maggi D & Cordera R 2006 High-molecular weight adiponectin isoforms increase after biliopancreatic diversion in obese subjects. *Obesity (Silver Spring)* 14 1511-1514.

Schaffler A, Binart N, Scholmerich J & Buchler C 2005a Hypothesis paper Brain talks with fat--evidence for a hypothalamic-pituitary-adipose axis? *Neuropeptides* 39 363-367.

Schaffler A, Neumeier M, Herfarth H, Furst A, Scholmerich J & Buchler C 2005b Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1732 96-102.

Schaffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarner I, Scholmerich J, Muller-Ladner U & Gay S 2003 Adipocytokines in synovial fluid. *Jama* 290 1709-1710.

Schaffler A, Buchler C, Muller-Ladner U, Herfarth H, Ehling A, Paul G, Scholmerich J & Zietz B 2004 Identification of variables influencing resistin serum levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 36 702-707.

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

Bibliografía

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G & Lodish HF 1995b A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 270 26746-26749.

Schobitz B, de Kloet ER, Sutanto W & Holsboer F 1993 Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* 5 1426-1435.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P & Baskin DG 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98 1101-1106.

Schwartz MW, Woods SC, Seeley RJ, Barsh GS, Baskin DG & Leibel RL 2003 Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? *Diabetes* 52 232-238.

Senolt L, Pavelka K, Housa D & Haluzik M 2006 Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 35 247-252.

Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawarabayashi T, Futagami K & Gomita Y 2004a Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides* 25 279-287.

Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T & Walsh K 2004b Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 279 28670-28674.

Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N & Walsh K 2005 Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* 11 1096-1103.

Shirley B 1984 The food intake of rats during pregnancy and lactation. *Lab Anim Sci* 34 169-172.

Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M, Onishi Y, Ono H, Inukai K, Abe M et al. 2002 Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes* 51 1737-1744.

Sieminska L, Cichon-Lenart A, Kajdaniuk D, Kos-Kudla B, Marek B, Lenart J & Nowak M 2006 [Sex hormones and adipocytokines in postmenopausal women]. *Pol Merkur Lekarski* 20 727-730.

Bibliografía

Silveira Rodriguez MB, Gomez-Pan A & Carraro Casieri R 2006 [New approaches in obesity treatment: the gastrointestinal tract as an endocrine organ]. *Med Clin (Barc)* 127 300-305.

Smith MS, Freeman ME & Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96 219-226.

Smith MS, McLean BK & Neill JD 1976 Prolactin: the initial luteotropic stimulus of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 98 1370-1377.

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

Stenlof K, Wernstedt I, Fjallman T, Wallenius V, Wallenius K & Jansson JO 2003 Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88 4379-4383.

Steppan CM & Lazar MA 2002 Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends In Endocrinology And Metabolism* 13 18-23.

Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ & Lazar MA 2005 Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 25 1569-1575.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001a The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409 307-312.

Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD et al. 2001b A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 502-506.

Szmitko PE, Teoh H, Stewart DJ & Verma S 2007 Adiponectin and cardiovascular disease: state of the art? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 H1655-1663.

Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, Shimomura I, Hotta K, Kuriyama H, Kihara S et al. 2000 Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 861-868.

Bibliografía

Tamura T, Yoneda M, Yamane K, Nakanishi S, Nakashima R, Okubo M & Kohno N 2007 Serum leptin and adiponectin are positively associated with bone mineral density at the distal radius in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 56 623-628.

Thalmann S & Meier CA 2007 Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res* 75 690-701.

Theisen FM, Haberhausen M, Firnges MA, Gregory P, Reinders JH, Remschmidt H, Hebebrand J & Antel J 2007 No evidence for binding of clozapine, olanzapine and/or haloperidol to selected receptors involved in body weight regulation. *Pharmacogenomics J* 7 275-281.

Thyfault JP, Hedberg EM, Anchan RM, Thorne OP, Isler CM, Newton ER, Dohm GL & deVente JE 2005 Gestational diabetes is associated with depressed adiponectin levels. *J Soc Gynecol Investig* 12 41-45.

Tigno XT, Selaru IK, Angeloni SV & Hansen BC 2003 Is microvascular flow rate related to ghrelin, leptin and adiponectin levels? *Clin Hemorheol Microcirc* 29 409-416.

Tilg H & Moschen AR 2006 Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6 772-783.

Trayhurn P 2007 Adipocyte biology. *Obes Rev* 8 Suppl 1 41-44.

Trayhurn P & Beattie JH 2001 Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60 329-339.

Trayhurn P & Wood IS 2004 Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92 347-355.

Trayhurn P, Duncan JS & Rayner DV 1995 Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* 311 729-733.

Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG & Rayner DV 1999 Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 1 22-28.

Trayhurn P, Duncan JS, Nestor A, Thomas MEA & Rayner DV 1994 Chemiluminescent detection of mRNAs on northern blots with digoxigenin end-labelled oligonucleotides. *Anal Biochem* 222 224-230.

Bibliografía

Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS & Chrousos GP 1997 Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 82 4167-4170.

Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD et al. 1996 A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379 69-72.

Virtanen KA, Lonroth P, Parkkola R, Peltoniemi P, Asola M, Viljanen T, Tolvanen T, Knuuti J, Ronnema T, Huupponen R et al. 2002 Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87 3902-3910.

Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P et al. 2003 Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 278 40352-40363.

Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C & Jansson JO 2002 Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8 75-79.

Wang Y, Sun Y & Qiu H 2004 Expression of resistin mRNA in adipose tissue of rat model with polycystic ovarian syndrome and its implication. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 24 621-624.

Wang Z, Masternak MM, Al-Regaiey KA & Bartke A 2007 Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. *Endocrinology* 148 2845-2853.

Way JM, Görgüm CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver Jr WO, Willson TM, Kliewer SA & Hotamisligil GS 2001 Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *The Journal of Biological Chemistry* 276 25651-25653.

Wernstedt I, Edgley A, Berndtsson A, Faldt J, Bergstrom G, Wallenius V & Jansson JO 2006 Reduced stress- and cold-induced increase in energy expenditure in interleukin-6-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291 R551-557.

Wesson DW & McGinnis MY 2006 Stacking anabolic androgenic steroids (AAS) during puberty in rats: A neuroendocrine and behavioral assessment. *Pharmacol Biochem Behav* 83 410-419.

Bibliografía

Wilkinson M, Wilkinson D, Wiesner G, Morash B & Ur E 2005 Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology* 81 19-30.

Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B & Tilg H 2004 Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 323 630-635.

Worda C, Leipold H, Gruber C, Kautzky-Willer A, Knofler M & Bancher-Todesca D 2004 Decreased plasma adiponectin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 191 2120-2124.

Yamamoto K, Kiyohara T, Murayama Y, Kihara S, Okamoto Y, Funahashi T, Ito T, Nezu R, Tsutsui S, Miyagawa JI et al. 2005 Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gut* 54 789-796.

Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R & Kadowaki T 2003 Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3 243-254.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N et al. 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7 941-946.

Yanase S, Sugiyama T, Sugaya A, Shen XX, Minoura H & Toyoda N 1997 Hexokinase II activity and messenger ribonucleic acid abundance in adipose tissue and skeletal muscle during pregnancy and lactation in rats. *Am J Obstet Gynecol* 176 651-655.

Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC & Gong DW 2006 Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 E1253-1261.

Yang X, Enerback S & Smith U 2003 Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res* 11 1182-1191.

Yoda M, Nakano Y, Tobe T, Shioda S, Choi-Miura NH & Tomita M 2001 Characterization of mouse GBP28 and its induction by exposure to cold. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 75-83.

Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y et al. 2000 Adiponectin, a new member of the family of

Bibliografía

soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 96 1723-1732.

Yu YH & Ginsberg HN 2005 Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res* 96 1042-1052.

Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Korita D, Takemura M & Fujii S 2003 Resistin is expressed in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 88 1394-1397.

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



ADENDA: ALGUNAS REFLEXIONES

Adenda: Algunas Reflexiones



«No sé cómo puedo ser visto por el mundo, pero en mi opinión, me he comportado como un niño que juega al borde del mar, y que se divierte buscando de vez en cuando una piedra más pulida y una concha más bonita de lo normal, mientras que el gran océano de la verdad se exponía ante mí completamente desconocido.» Isaac Newton

Hace tiempo leí la dedicatoria de un libro que rezaba de la siguiente manera: “No os obstinéis en descubrir algo práctico. Si no lo conseguís, los que os siguen lo lograrán. Vosotros sólo preocupaos de indagar y soñar”⁴. Soñar, es una palabra hermosa que representa sin lugar a dudas el avance tecnológico y la ciencia, porque a mi juicio, son un sueño hecho realidad. De todas las acepciones que el diccionario da a la palabra soñar, hay una que me gusta particularmente y que quizá define el sentido de todo lo demás: anhelar persistentemente algo. No recuerdo muy bien el momento pero desde muy pequeño deseé jugar con microscopios y tubos de ensayo. Un sueño que poco a poco se iría materializando hasta que llegué a culminar mis estudios de licenciatura en biología. Durante los 5 años de carrera comprobé cuanto me interesaba la ciencia y desarrollé una cierta fascinación por todos aquellos aspectos relacionados con los pro-

⁴ John D. Rockefeller- a los científicos presentes en el acto de inauguración del Rockefeller Institute, hoy universidad.

Adenda: Algunas Reflexiones

cesos moleculares, celulares, fisiológicos etc. El paso por los años de licenciatura fue una experiencia transformadora, conocí a Marisa Puerta y empecé a trabajar en aspectos concretos de la biología, aspectos que me han tenido absorbido durante estos últimos años, coincidiendo con los años de mi doctorado. Creo que he recibido mucho y que algo he aportado al conocimiento general dentro de mi campo, aunque ninguno de estos sueños tiene sentido sino se responde a dos preguntas que creo fundamentales: y todo esto ¿por el capricho de un niño, por un deseo sin más, por títulos, méritos y respeto? y en segundo lugar ¿qué clase de “científico” quiero ser?. Hace tiempo deje de creer que las cosas se tienen que hacer porque simplemente apetece, escuchando sólo las llamadas de un instinto animal, para empezar a hacerlas porque tienen un sentido, porque hay una necesidad o porque alguien recibirá un beneficio de ello. Puede parecer al que lee estas líneas un principio que denota egoísmo o interés, pero debo decir que nada más lejos de la realidad. En sí mismo, lo que pretendo es encontrar sentido a las cosas y a mi inversión del tiempo. Y la pregunta aún está en el aire ¿por qué quiero ser doctor?, ¿por qué dedicar mi vida a la ciencia?, ¿por qué invertir tanto en esta actividad?, ¿merece la pena? y es que conozco a tantos que están en esto por estar, porque es la mejor opción; yo busco algo más que eso. Debo confesar que es una cuestión en la que he reflexionado durante estos años, en paralelo a mis experimentos. Y puesto que he sacado mis propias conclusiones, también quiero reflejarlas en este trabajo global que aquí he presentado.

Puedo resumir los interrogantes ya descritos en dos cuestiones básicas que son: ¿por qué quiero ser científico? y ¿qué clase de científico quiero llegar a ser?. Para responder a estas preguntas revisé algunos ejemplos de científicos a lo largo de la historia que pudieran inspirarme en la búsqueda de mis propias respuestas. De todos los estudiados quiero destacar dos de ellos, pioneros y adelantados a su época, eruditos don-

Adenda: Algunas Reflexiones

de los haya que trabajaron en campos muy diferentes a saber: **Isaac Newton y Carl von Linné.**

Isaac Newton, nace el 4 de enero de 1643 en Woolsthorpe, Lincolnshire, Inglaterra. Hijo de campesinos puritanos tiene una vida un tanto compleja debido a que su padre muere poco después de su nacimiento. Se gradúa en el Trinity College como un alumno mediocre. Cuentan las crónicas, que no acudía frecuentemente a sus clases, debido a que pasaba horas en la biblioteca estudiando por su cuenta. Es uno de los científicos de vocación autodidacta más grandes de su tiempo y cuyos descubrimientos y desarrollos científicos han sido el sustento de la ciencia moderna. Desarrolla el cálculo diferencial e integral, realiza trabajos sobre la luz, define las leyes de la gravitación universal, las leyes de la dinámica (inercia, interacción y fuerza, acción-reacción) incluso hace aportaciones a la política. Pese a todos los descubrimientos científicos por los que es recordado, Newton destaca de una manera sobresaliente en el campo de la teología. Dedicó más tiempo al estudio de la Biblia que de las ciencias, escribiendo 1,400,000 palabras de teología en diferentes obras, con tintes muy variados. Fue respetado durante su vida, como pocos científicos, prueba de ello fueron los cargos que ostentó como miembro del parlamento, custodio de la casa de la moneda, presidente de la Royal Society y por último la concesión del título de *Sir*. Sin lugar a dudas, la obra de Isaac Newton es modelo de un científico adelantado a su época que busca respuesta a múltiples interrogantes y que usa de manera científica la razón unida con la fe.

Carl von Linné, nace en Råshult, Suecia el 23 de mayo de 1707. Hijo del pastor luterano Nils Ingemarsson y Kristina Brodersonia, desde muy pequeño comienza a cultivar su propio jardín cerca de la iglesia donde oficia su padre. Estudia medicina en la universidad de Lund y posteriormente se traslada a Uppsala y es en esta última donde

Adenda: Algunas Reflexiones

entra en contacto con grandes científicos como Celsius o Rudbeck. Lleva a cabo diferentes misiones científicas en Laponia y Dalecarlia, por encargo de la academia de ciencias y no sólo en Suecia sino en otras partes del mundo. Se convierte en un científico importante en su época ocupando la cátedra de botánica de la universidad de Uppsala, es médico de la casa real sueca y finalmente obtiene un título nobiliario. Tiene intereses científicos en el campo de la mecánica, de la óptica y en general de la física. Como hechos curiosos destacan su inversión de la escala de temperaturas de Celsius que hasta 1745 fijaba el 0°C como punto de ebullición del agua y el 100°C como punto de fusión del agua. También desarrolla un sistema para la producción de perlas artificiales. Pero no es recordado por estos hechos sino por sus aportaciones a la botánica y la zoología. La frase: *Nomina si nescis, perit et cognitio rerum, (Si ignoras el nombre de las cosas, desaparece también lo que sabes de ellas)*, le pertenece y define perfectamente su propósito científico. Una de sus obras más importantes es *Systema Naturae*, donde tras estudiar personalmente mediante la observación diferentes plantas y animales, realiza una clasificación de los mismos. Linneo es creacionista, según él, los animales y los vegetales han sido creados por Dios de acuerdo al relato del Génesis y por tanto su objetivo fundamental es demostrar la grandeza de Dios a través de la naturaleza. Debido a esta idea, a partir de la décima edición de su obra *Systema Naturae*, Linneo generaliza una forma de nomenclatura binomial basado en el concepto de género y especie del libro del Génesis Bíblico. Hoy, reconocemos a Linneo como el padre de la biología moderna, en concreto de la botánica y de la zoología y sin lugar a dudas es uno de los científicos que más han producido a lo largo de la historia de la ciencia.

Adenda: Algunas Reflexiones

Tanto Linneo como Newton comparten algunas características, que a mi juicio, son de vital importancia. Ambos, se dedican con pasión a observar la naturaleza y así como fruto pueden sacar conclusiones, y en su caso, conclusiones que han cambiado la historia del conocimiento. Este hecho que parece evidente, es de vital importancia porque observan, conocen, exploran, se quedan fascinados por ese mundo natural, y es éste el objeto de su fascinación y encanto. Así, el objetivo no es otro que observar la naturaleza, aunque esta observación va ligada a una experiencia religiosa profunda. Ambos científicos tienen un interés especial en lo religioso y por tanto no es de extrañar que su obra trate de magnificar al Científico por excelencia. En ellos, por tanto, se encarna un modelo de hombre de fe-científico.

A mi juicio, la ciencia hoy, adolece de las dos características que hacen notorios a Linneo, a Newton y a otros. En un mundo de enfermedades, de políticas científicas, de dinero farmacéutico, de presión en la producción científica no hay sitio para jugar con las conchas en la orilla de ese vasto océano que es la verdad, contemplando a Aquel que las moldeó. Pero no solo eso, sino que faltan científicos de convicciones, de principios morales férreos, inquebrantables, fieles a la verdad como la brújula al polo. En un mundo donde la gente mira a la ciencia como la solución a sus problemas y le confieren un rango de credibilidad muy elevado, ¡cuanto por el bien de la humanidad se podría hacer y qué poco se hace!. Hoy, y espero se me permita recalcar la idea, necesitamos científicos que busquen respuestas, pero que en si mismos sean ejemplo en lo moral, en lo ético, en el carácter. Considero que aun hoy es posible conjugar en uno mismo razón y fe, ciencia y creencia. Y no sólo conjugar, sino hacer de esto el objetivo de tu vida científica. Y así, bajo ese prisma, erigir una trayectoria personal y profesional basada en un sistema de principios consecuentes que no se desmoronen, que no se compren ni se vendan. Este es mi sueño actual y como aquel que vislumbé en la in-

Adenda: Algunas Reflexiones

fancia será perseguido hasta que se haga realidad. Sirvan estas reflexiones como preámbulo de una trayectoria científica, como el deseo de lo que quiero llegar a tener y como una declaración de principios.

Sergio Caja Galán
Septiembre de 2007

“La mayor necesidad del mundo es la de hombres que no se vendan ni se compren; hombres que sean sinceros y honrados en lo más íntimo de sus almas, [...], hombres cuya conciencia sea tan leal al deber como la brújula al polo; hombres que se mantengan de parte de la justicia aunque se desplomen los cielos”. Ellen G. White