



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

PAPEL DE INTERLEUQUINA-6 EN LA
REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS
ENERGÉTICA DURANTE LA GESTACIÓN
Y LA LACTANCIA

Tesis Doctoral

Patricia Pazos Mendoza
2012



DEPARTAMENTO DE FISIOLoxÍA
Facultade de Medicina

R. San Francisco, s/n
15782 Santiago de Compostela
Tel. 881 813 407. Fax 881 812 432

Dr. Carlos Diéguez González, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

Dr. Luis Lima Rodríguez, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

Dra. María del Carmen García García, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

Certifican que:

la presente Tesis Doctoral titulada **“Papel de IL-6 en la regulación de la homeostasis energética durante la gestación y la lactancia”**, elaborada por Patricia Pazos Mendoza, ha sido realizada bajo su dirección en los Laboratorios de Neurociencia “Ramón Domínguez” del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firman la presente en Santiago de Compostela a 28 de Marzo de 2012.

Fdo. Carlos Diéguez González

Fdo. Luis Lima Rodríguez

Fdo. María del Carmen García García

cíbero6n



Instituto de Investigación Sanitaria
SANTIAGO DE COMPOSTELA

**CIBER FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD
Y LA NUTRICIÓN**

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, amigos, familia y compañeros, y que han colaborado a la realización de esta tesis y de los que, de una u otra forma, he aprendido.

En primer lugar, a los directores de esta tesis; a María García por haber sido además de directora una compañera de batallas, a Luís Lima por su ayuda resolviendo las más variopintas cuestiones que han surgido en el laboratorio y por los buenos momentos y a Carlos Diéguez por su inestimable apoyo en los momentos más difíciles de esta andadura.

A mi compañera Eva que ha estado conmigo desde el inicio y con la que he podido compartir muchos momentos y con la que espero poder seguir compartiendo muchos más.

A Manel, Alba, Ana y Verónica los famosos “chicos de prácticas”, y a Juan y Joan por su ayuda con las tareas de laboratorio y por su simpatía. Gracias chicos!!

A mis compañeros del departamento de fisiología por el compañerismo que me han brindado especialmente a Marcos Ríos por su apoyo y por ser un ejemplo a seguir, a Katia por ser como es y por su amistad (nos veremos en Brasil), a Hugo por ofrecirme su amistad y ayuda desde mi llegada al laboratorio, a Rucha por iniciarme en la aventura de las extracciones y el TAQMAN, a Luz y Ana por su colaboración especialmente con las *in situs* y las tinciones, a Amparo por su paciencia al ayudarme en mis peripecias con los western, a Marta por sus consejos, a las chicas del “taper” por brindarme su compañía, a Pepe por su gran ayuda con mis conflictos informáticos y por su apoyo y a Susana Sangiao por ser una persona admirable y por brindarme su apoyo en todo momento.

Quiero mostrar un agradecimiento especial a mis amigos y a mi familia, que siempre han confiado en mi capacidad para finalizar este trabajo animándome a seguir hasta el final.

Pero mi mayor y más especial agradecimiento se lo debo a mis padres por su apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado en mi vida, hayan sido buenas o malas, y porque a ellos les debo todo lo que soy.

Y por supuesto a Jose que ha vivido conmigo tanto lo bueno como lo malo de esta etapa. Gracias por vuestro cariño.

INDICE**Página**

INTRODUCCIÓN.....	1
1. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA	3
2. SEÑALES AFERENTES EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	5
2.1 Señales de regulación a corto plazo: señales de saciedad.....	6
2.2 Señales de regulación a largo plazo: señales de adiposidad.....	6
2.2.1 <u>Leptina</u>	7
2.2.2 <u>Insulina</u>	9
2.2.3 <u>Ghrelin</u>	11
2.3 Otras señales de adiposidad: las adipoquinas	12
2.3.1 <u>Adiponectina</u>	14
2.3.2 <u>Resistina</u>	15
2.3.3 <u>Factor de necrosis tumoral (TNF-α)</u>	16
2.3.4 <u>Interleuquinas</u>	17
2.3.4.1 Interleuquina-1 (IL-1).....	18
2.3.4.2 Interleuquina-6 (IL-6)	19
<i>Receptor de IL-6</i>	21
<i>Mecanismos de señalización de IL-6</i>	21
<i>IL-6 como regulador de la homeostasis energética</i>	23
3. CIRCUITOS CENTRALES EN EL CONTROL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA	28
3.1 Circuitos hipotalámicos	29
3.1.1 <u>El núcleo Arcuato</u>	29
3.1.1.1 Neuropéptido Y (NPY).....	30
3.1.1.2 Sistema de las melanocortinas	31
3.1.2 <u>El área hipotalámica lateral (AHL)</u>	34
3.1.2.1 Hormona concentradora de la melanina (MCH)	34
3.1.2.2 Orexinas	35
3.1.3 <u>El núcleo paraventricular (NPV)</u>	35
3.1.3.1 La hormona liberadora de la corticotropina (CRH).....	36
3.1.3.2 La hormona liberadora de la tirotropina (TRH).....	37
3.1.4 <u>Otros núcleos hipotalámicos: ventromedial y dorsomedial (NDM y NVM)</u>	38
3.2 Señalización metabólica y circuitos hipotalámicos	40
4. SEÑALES EFERENTES EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA	42
4.1 El gasto energético	44
4.2 Tejido adiposo y homeostasis energética	46
4.2.1 <u>Termogénesis adaptativa y tejido adiposo marrón</u>	48
4.2.1.1 La proteína desacoplante UCP-1	50
4.2.1.2 Regulación transcripcional de UCP-1, termogénesis adaptativa y biogénesis mitocondrial.....	52
4.2.1.3 Otras proteínas homólogas de UCP-1.....	58
4.2.2 <u>Metabolismo lipídico</u>	60

4.2.2.1 Síntesis de ácidos grasos.....	60
4.2.2.2 Lipólisis	64
4.2.2.3 β -oxidación de los ácidos grasos	66
5. GESTACIÓN Y LACTANCIA COMO MODELOS FISIOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	69
5.1 Gestación.....	70
5.2 Lactancia.....	82
OBJETIVOS	93
MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
1. DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	99
1.1 Animales de experimentación	99
1.2 Modelos experimentales (gestación y lactancia).....	99
2. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN CORPORAL.....	102
2.1 Resonancia magnética	102
2.2 Disección y pesada de depósitos grasos.....	103
3. ANALISIS DE GASTO ENERGETICO, COEFICIENTE RESPIRATORIO Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA.....	103
4. ENSAYOS COLORIMÉTRICOS ENZIMÁTICOS	104
4.1 Determinación cuantitativa de glucosa en suero.....	104
4.2 Determinación cuantitativa de colesterol en suero	105
4.3 Determinación cuantitativa de triglicéridos en suero.....	105
5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS EN HIGADO. TINCIÓN IÓN CON OIL-RED.....	106
6. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ARNm	107
6.1 Extracción de ARN total	107
6.2 Retrotranscripción (RT).....	108
6.3 PCR en tiempo real (Taqman).....	109
6.4 Hibridación in situ	113
6.4.1 Cortes histológicos	113
6.4.2 Marcaje de las sondas	114
6.4.3 Pre-hibridación	115
6.4.4 Hibridación	116
6.4.5 Lavados	116
6.4.6 Cuantificación	117
6.4.7 Controles de la hibridación.....	117
7. DETERMINACION DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	118
7.1 Obtención y cuantificación de extractos de proteína total	118
7.2 Western blot	119
7.2.1 Electroforesis	119
7.2.2 Transferencia	120
7.2.3 Inmunodetección	120
7.2.4 Cuantificación	121
8. ANÁLISIS ESTADISTICO	121

RESULTADOS	123
1. EFECTO DE IL-6 SOBRE LA EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA.....	125
1.1. Composición corporal: resonancia magnética	128
1.2. Composición corporal: disección y pesada de los depósitos grasos e hígado	131
2. INGESTA.....	142
3. PERFIL BIOQUÍMICO BASAL DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA	144
4. PERFIL DE EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE IL-6 Y SU RECEPTOR IL-6Rα DURANTE LA GESTACIÓN	147
5. INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 SOBRE LOS CIRCUITOS CENTRALES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO.....	150
6. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 SOBRE LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN Y EL GASTO ENERGÉTICO BASAL Y DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA	163
6.1. Evolución del peso del TAM durante la gestación	163
6.2. Contenido lipídico en el TAM durante la gestación intermedia.....	165
6.3. Expresión de IL-6 y su receptor (IL-6Rα en TAM durante la gestación.....	166
6.4. Efecto de IL-6 sobre la capacidad termogénica del TAM durante la gestación.....	168
6.4.1. <u>Perfil de expresión génica de UCP-1 y UCP-3 en TAM durante la gestación</u>	<u>168</u>
6.4.2. <u>Perfil de expresión proteica de UCP-1 y UCP-3 en TAM durante la gestación</u>	<u>170</u>
6.4.3. <u>Efecto de IL-6 sobre las vías moleculares implicadas la activación de la termogénesis adaptativa en el TAM durante la gestación</u>	<u>173</u>
6.5. Efecto de la deficiencia de IL-6 sobre el gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora durante la gestación.....	183
6.6. Evolución del peso del TAM durante la lactancia	190
6.7. Expresión de IL-6 y su receptor IL-6Rα en TAM durante la lactancia	191
6.8. Efecto de IL-6 sobre la capacidad termogénica del TAM durante la lactancia: perfil de expresión génica de UCP-1 y UCP-3 en TAM durante la lactancia	192
7. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 SOBRE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO LIPÍDICO EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO (TAB) Y EL HÍGADO DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA.....	194
7.1. Metabolismo lipídico en el TAB durante la gestación	194
7.1.1 <u>Expresión de IL-6 en el TAB durante la gestación</u>	<u>194</u>

7.1.2. <u>Efecto de IL-6 sobre la expresión en el TAB de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico durante la gestación</u>	195
7.1.2.1 Captación de ácidos grasos y movilización (lipólisis) de triglicéridos	195
7.1.2.2 Síntesis de novo y oxidación de ácidos grasos	199
7.2. Metabolismo lipídico en el TAB durante la lactancia	201
7.2.1 <u>Expresión de IL-6 en el TAB durante la lactancia</u>	201
7.2.2 <u>Efecto de IL-6 sobre la expresión en el TAB de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico durante la lactancia</u>	202
7.2.2.1. Captación de ácidos grasos y movilización (lipólisis) de triglicéridos	202
7.2.2.2. Síntesis de novo y oxidación de ácidos grasos	205
7.3. Metabolismo lipídico en el hígado durante la gestación	207
7.3.1. <u>Contenido lipídico en el hígado durante la gestación intermedia y a término</u>	207
7.3.2. <u>Expresión de IL-6 y de IL-6Rα en hígado durante la gestación</u>	209
7.3.3. <u>Efecto de IL-6 sobre enzimas implicadas en el metabolismo lipídico en hígado durante la gestación: síntesis de novo y oxidación de ácidos grasos</u>	210
7.4. Metabolismo lipídico en el hígado durante la lactancia	212
7.4.1. <u>Contenido lipídico en el hígado durante la lactancia temprana e intermedia</u>	212
7.4.2. <u>Expresión de IL-6 y de IL-6Rα en hígado durante la lactancia</u>	214
7.4.3. <u>Efecto de IL-6 sobre enzimas implicadas en el metabolismo lipídico en hígado durante la lactancia: síntesis de novo y oxidación de ácidos grasos</u>	215
DISCUSION	217
CONCLUSIONES	249
BIBLIOGRAFÍA	253

Abreviaturas

ACC	Ácido graso carboxilasa
ACTH	Hormona adenocorticotropa
4-AF	4-aminofenazona
ADP	Adenosina difosfato
AgRP	Proteína relacionada con agouti
AHL	Área hipotalámica lateral
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Adenosina monofosfato quinasa
aP2	Proteína intracelular de unión a lípidos específica del adipocito
APO-CII	Apolipoproteína CII
ARC	Núcleo Arcuato
ASP	Péptido estimulante de acilación
ATP	Adenosina trifosfato
CART	Tránsito regulado por anfetamina y cocaína
CCK	Colecistoquinina
C/EBPs	Proteínas inductoras de la transcripción que se unen a la secuencia CCAAT
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CPT-1	Carnitin palmitoil transferasa-1
DACM-1	Deshidrogenasa de acetil-CoA de cadena media
DAP	Dihidroxiacetona fosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
DGAT	Diacilglicerol-aciltransferasa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
FAS	Ácido graso sintasa
GH	Hormona de crecimiento
GIP	Polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa
GK	Glicerol quinasa
GLP-1	Péptido 1 análogo al glucagón
GOD	Glucosa oxidasa
GPO	Glicerolfosfato deshidrogenada
HHA	Eje hipotálamo-hipófiso-adrenal
IL	Interleuquina
IL-6 KO	Deficiente en interleuquina- 6

IRS	Sustrato del receptor de insulina
LCFA	Ácidos grasos de cadena larga
LPL	Lipoproteína lipasa
LSH	Lipasa sensible a hormonas
MCH	Hormona concentradora de melanocortinas
MC-R	Receptor de melanocortinas
NDM	Núcleo dorsomedial
NPV	Núcleo para ventricular
NPY	Neuropéptido Y
α - MSH	Hormona estimulante de melanocitos
MCH	Hormona concentradora de melanina
NTS	Núcleo del tracto solitario
PAI-1	Inhibidor de los activadores del plasminógeno tipo I
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFA	Paraformaldehído
PGC-1	Coactivador 1 de PPAR α
POD	Peroxidasa
POMC	Proopiomelanocortina
PPAR	Familia de receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas
PYY	Péptido YY
RT	Retrotranscripción
SCD-1	Estearoil- CoA desaturasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
SOCS	Supresor de la señalización de citoquinas
SREBPs	Familia de proteínas de unión a elementos que responden a esteroides
TAB	Tejido adiposo blanco
TAM	Tejido adiposo marrón
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
UCP	Proteína desacoplante
WT	Wild type (genotipo salvaje)

INTRODUCCIÓN

1. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA: INTRODUCCIÓN

El mantenimiento del peso y composición corporal resulta clave para que los diversos tejidos y órganos puedan llevar a cabo sus funciones correctamente, y está determinado por la relación existente entre el aporte, el almacenamiento y la utilización de energía. La observación de que, tanto en animales como en humanos, el peso corporal tiende a mantenerse estable, a pesar de las fluctuaciones diarias en ingesta y gasto energético, llevó a algunos autores a postular la existencia de un sistema homeostático encargado del control del estado energético del individuo, de forma análoga a lo que ocurre con otras constantes biológicas (1,2). En este sistema estarían involucrados una gran variedad de órganos y tejidos entre los que figuran el cerebro, el hígado, el músculo, el tejido adiposo, el páncreas, el estómago o el intestino. Así, a nivel del cerebro existiría un centro regulador que actuaría integrando la información recibida en forma de señales de tipo endocrino, neural y metabólico acerca de la ingesta de alimentos, la absorción de nutrientes, las necesidades energéticas de los tejidos, o el tamaño y composición de los depósitos energéticos. En función de la información recibida, este centro regulador mediante señales eferentes, actuaría sobre la ingesta, el gasto energético, el metabolismo o el almacenamiento de sustratos energéticos en diversos órganos como la grasa en el tejido adiposo y el glucógeno en el hígado y el músculo.

La energía obtenida a partir de los alimentos ingeridos es inicialmente destinada a cubrir procesos esenciales a corto plazo para la supervivencia del individuo, como el mantenimiento de la temperatura corporal, la síntesis de proteínas, el mantenimiento de gradientes iónicos, la actividad locomotora, la eliminación de productos de desecho o la propia ingestión y digestión de los alimentos.

Una vez cubiertos estos procesos básicos, el resto de energía sería destinado al desarrollo de funciones biológicas no esenciales a corto plazo para el individuo y que representan un coste energético elevado, como por ejemplo la respuesta inmune, el crecimiento o la reproducción. De hecho, estos procesos se ven inhibidos en situaciones en las que el gasto energético supera la ingesta calórica y la movilización de los depósitos energéticos. Así, la directa relación entre balance energético y el éxito de los procesos reproductivos, se refleja en el hecho de que las mismas señales que aseguran el mantenimiento de un peso corporal estable, ejercen un efecto permisivo sobre los eventos neuroendocrinos que controlan la ovulación, la espermatogénesis y la fertilidad (3-5). Además, durante la gestación y la lactancia distintas estrategias fisiológicas

permiten una redistribución temporal y reversible de la energía corporal. Entre ellas se encuentran un incremento en la ingesta de alimentos, cambios en la distribución de sustratos metabólicos hacia el feto, placenta y glándula mamaria y un aumento de la eficiencia metabólica.

En último término, el exceso de energía, de existir, contribuiría al incremento de los depósitos grasos del individuo. De esta forma, existen situaciones patológicas donde la capacidad de regulación del sistema se sobrepasa y el balance energético se ve afectado, como es el caso de la obesidad caracterizada por un incremento de reservas energéticas en forma de grasa, resultado de un desequilibrio crónico en el balance entre la ingesta y el gasto energético, la distribución de las reservas energéticas y la capacidad de adipogénesis (6). El incremento de la incidencia de obesidad en la sociedad moderna supone un problema social y de salud pública de primera magnitud y es debido, en gran medida, a la adopción de un nuevo estilo de vida caracterizado por un consumo creciente de comidas hipercalóricas, y a un mayor sedentarismo (7,8). Sin embargo, además de la influencia de factores ambientales (sociales, emocionales y culturales), la susceptibilidad al desarrollo de obesidad puede estar influida por factores metabólicos, fisiológicos, genéticos, celulares y moleculares (9-11). Para identificar cual o cuales de estos factores son decisivos en el desarrollo de esta patología y no una mera consecuencia de la misma, es necesario comprender en detalle la interacción de las distintas señales hormonales, metabólicas y vías neurales moduladoras de la estabilidad del peso corporal y el balance energético (Fig.1).

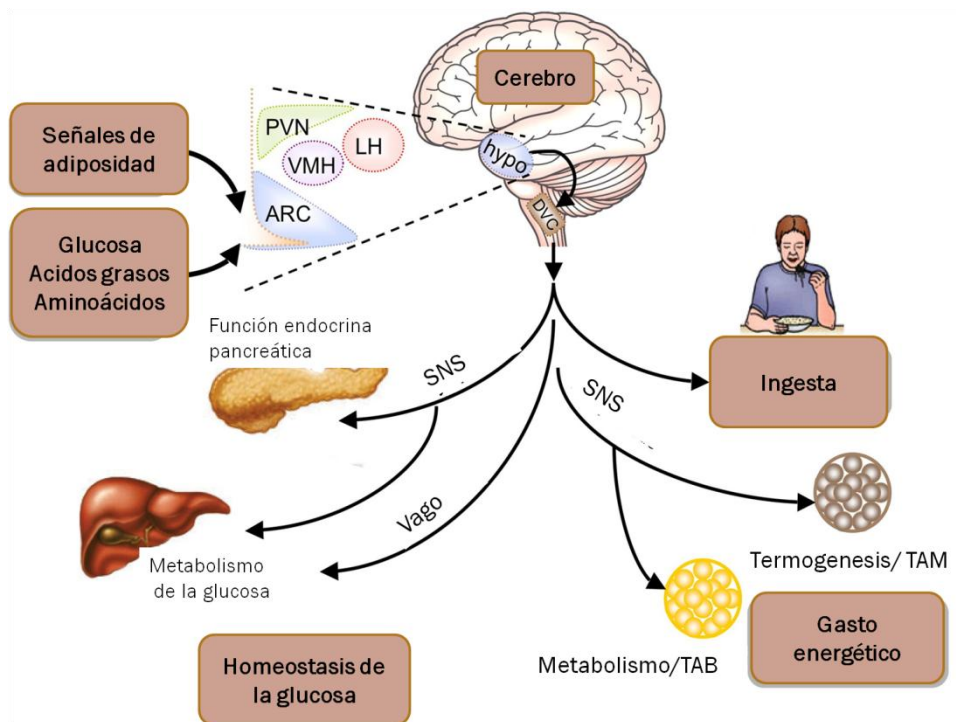


Figura 1. Diferentes vías que participan en la homeostasis energética. Modificada de Blouet C, 2010 Behavioural Brain Research 209; 1-12.

2. SEÑALES AFERENTES EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

El cerebro necesita recibir constantemente información acerca del estado energético de la periferia para promover respuestas adecuadas tanto en la toma de decisiones a corto plazo, como por ejemplo la iniciación de la ingesta y el tamaño de las comidas, como en lo que respecta a procesos a largo plazo como el mantenimiento del peso corporal.

Las señales aferentes que transmiten información acerca del estado de las reservas energéticas en la periferia al SNC incluyen hormonas como insulina y leptina además de señales relacionadas con los nutrientes como los niveles circulantes de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos.

Las señales que llegan de la periferia pueden ser clasificadas en dos grandes categorías, aquellas que son generadas durante las comidas para causar saciedad (señales de saciedad) y aquellas que son producidas en proporción a la cantidad de reservas grasas del organismo (señales de adiposidad). A pesar de ello los balances a corto y a largo plazo de la homeostasis energética están controlados por mecanismos distintos aunque interrelacionados, y algunas señales determinantes de saciedad (nutrientes y hormonas gastrointestinales) actúan de forma coordinada con las señales de regulación a largo plazo de la homeostasis energética (12).

2.1 Señales de regulación a corto plazo: señales de saciedad

En humanos el proceso de iniciación de la ingesta está profundamente influenciado por factores sociales, culturales y ambientales relacionados con el estilo de vida y solamente en situaciones de privación energética, por señales bioquímicas (13). El control bioquímico de la ingesta calórica es ejercido principalmente sobre la terminación de la comida, controlando la sensación de plenitud y el tamaño de las comidas individuales dependiendo de los requerimientos energéticos (14). De este modo, tras la ingesta, la presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal es detectada por mecanorreceptores que informan del grado de distensión de diferentes segmentos del mismo; mientras que la información acerca de la composición de los mismos depende de la existencia de quimiorreceptores a este nivel. La estimulación de ambos tipos de receptores desencadena la secreción por parte de diversas células de la pared gástrica e intestinal de una amplia variedad de péptidos como enterostatina (15), bombesina (16), colecistoquinina (CCK) (17,18), GLP-1 (19), gastrina y péptido YY (PYY) (20,21) etc. que proporcionan información al cerebro sobre el estado nutricional del individuo, destinada a la finalización de la ingesta, actuando por tanto como señales de saciedad. En contraposición a estas señales de saciedad, a nivel del tracto gastrointestinal también se sintetiza y libera la hormona ghrelina, implicada en el inicio de las comidas, hecho que se ve reflejado en las fluctuaciones diarias de sus niveles circulantes, que aumentan antes de la ingesta de alimentos decayendo rápidamente tras la misma (22,23).

Todas estas señales periféricas de saciedad, pueden actuar a través de la estimulación de fibras vagales aferentes que proyectan al núcleo del tracto solitario (NTS) o bien accediendo directamente a través de la circulación al sistema nervioso central (SNC), siendo integradas a nivel hipotalámico para participar de este modo en la regulación de la duración de las comidas (24). Estas señales de saciedad que afectan el tamaño de las comidas individuales, no están directamente involucradas en la regulación del peso corporal ni de la adiposidad corporal. Así, el tratamiento a largo plazo con colecistoquinina (CCK) no produce modificaciones de peso corporal en ratones (25).

2.2 Señales de regulación a largo plazo: señales de adiposidad

Además de las señales de regulación a corto plazo, existen otras señales periféricas aferentes que son secretadas en proporción al contenido de grasa corporal, principalmente insulina y leptina (26), aunque también ghrelina (27). Estas señales,

modulan la ingesta y el gasto energético a fin de mantener a largo plazo la estabilidad del peso y composición corporal y actúan de manera coordinada con las señales de saciedad ajustando ingesta y gasto energético, con el fin de asegurar la homeostasis energética a largo plazo (28,29).

2.2.1. Leptina

La leptina, producto del gen *ob*, es una hormona producida y secretada al torrente sanguíneo principalmente por el tejido adiposo, en proporción al número y tamaño de los adipocitos (30). De esta manera, los niveles circulantes de leptina tienen relación directa con los niveles de depósito graso y son un fiel reflejo del estatus energético del individuo. Así, sus concentraciones plasmáticas se encuentran elevadas en humanos obesos y en modelos animales de obesidad, mientras que disminuyen en situaciones de balance energético negativo como el ayuno (31). La leptina atraviesa la barrera hematoencefálica mediante un sistema saturable, y ejerce la mayor parte de sus efectos sobre el balance energético a nivel central, inhibiendo la ingesta y estimulando el gasto energético a través de su interacción con receptores específicos presentes en distintos núcleos hipotalámicos y extrahipotalámicos (32). En roedores, una señalización por leptina deficiente, ya sea por falta de la hormona (como en los ratones *ob/ob*) o de la forma larga de su receptor (*Ob-Rb*), que es la forma biológicamente activa, deriva en obesidad espontánea de aparición temprana asociada a hiperfagia, gasto energético reducido, hipotermia, infertilidad y numerosas complicaciones metabólicas, incluyendo hiperglucemia, hiperinsulinemia y dislipidemia.

En humanos, defectos congénitos en la vía de la leptina también se asocian a una obesidad mórbida de aparición temprana (33). Sin embargo, esta situación es muy poco frecuente en la obesidad humana. Paradójicamente, los niveles de leptina en plasma de la gran mayoría de individuos obesos son elevados y proporcionales a su masa grasa lo que ha llevado a considerar la obesidad en estos individuos como un estado de resistencia a esta hormona (34). Han sido descritas diferentes causas posibles para explicar esta resistencia a la acción de la leptina, que podría deberse a defectos en el sistema de transporte hacia el SNC o bien en las vías de transducción post-receptor de la leptina.

A nivel hipotalámico, el receptor de leptina, se expresa abundantemente en los núcleos arcuato (ARC), dorsomedial (NDM), ventromedial (NVM) y área hipotalámica lateral (AHL) (35-37). En estos núcleos actúa regulando la actividad de circuitos neuronales

(productores de péptidos orexigénicos: NPY/AgRP, orexinas, MCH y anorexigénicos: POMC/CART...) y neuroendocrinos que en conjunto afectan no sólo la tasa de ingesta y la termogénesis sino también a rutas clave en el metabolismo de la glucosa y las grasas (38-40). Así, la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de leptina ejerce efectos tejido específicos sobre el metabolismo lipídico en el tejido adiposo y el hígado, que juega un papel central en la biosíntesis y utilización global de lípidos. Por un lado, actúa inhibiendo en ambos tejidos la síntesis de novo de ácidos grasos a través de la represión de la expresión de enzimas de la vía lipogénica (que analizaremos en más detalle en posteriores apartados) y reduciendo la capacidad de almacenamiento energético del tejido adiposo, al estimular además la lipólisis. Los efectos centrales de leptina sobre lipogénesis en el tejido adiposo parecen ser dependientes de la activación del sistema nervioso autónomo, puesto que no se observan tras una denervación simpática local.

No obstante a las acciones metabólicas de la leptina también podrían contribuir efectos directos de esta hormona sobre tejidos periféricos como el páncreas, el hígado, el corazón, el tejido adiposo y el músculo esquelético en los que, aunque en reducidas concentraciones, se expresa el receptor de esta hormona y donde se ha propuesto que una de sus funciones sería impedir la acumulación ectópica de lípidos previniendo de esta forma la lipotoxicidad.

En particular a nivel muscular leptina regula el metabolismo lipídico a través de dos mecanismos activados secuencialmente, el primero de ellos ejercido directamente a nivel del músculo y el segundo resultado de su acción a nivel hipotalámico. Así, en primer lugar estimula de forma selectiva y directa la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa en el músculo, a través de la fosforilación y consecuente activación de la subunidad catalítica $\alpha 2$ de la quinasa activada por AMP (AMPK). Esta enzima es un complejo heterotrimérico que se activa con el incremento en la relación de concentración intracelular de AMP/ATP. Un balance energético bajo, o lo que es lo mismo una concentración alta de AMP, regula a través del complejo AMPK, la actividad de varias enzimas que controlan el metabolismo lipídico y glucídico. Por tanto, AMPK regula la utilización de sustratos metabólicos por los tejidos al estimular procesos que implican una producción activa de ATP, como la oxidación de glucosa y ácidos grasos, e inhibir procesos que implican su utilización, como la síntesis de novo de ácidos grasos y colesterol. A lo largo de los últimos años diversos estudios han puesto de manifiesto el papel de este complejo enzimático como sensor intracelular de

la homeostasis energética que está involucrado en la regulación del balance energético en respuesta a hormonas (como leptina en este caso) y nutrientes tanto en tejidos periféricos como a nivel del SNC.

Además de en el hipotálamo, leptina puede actuar a nivel de otras áreas centrales implicadas en la regulación de la ingesta como el NTS en el tronco encefálico, donde se ha descrito la presencia de receptores para esta hormona (41). Como se mencionó anteriormente este núcleo constituye la primera estación de relevo y procesamiento de la información sensorial (señales de saciedad) procedente del tracto gastrointestinal a través de aferencias vagales, y sus neuronas establecen conexiones sinápticas con neuronas de otros centros superiores dentro de la denominada vía aferente visceral general, que incluye además de otras áreas encefálicas basales al hipotálamo. Diversas evidencias experimentales indican que el posible papel de leptina en el NTS consistiría en potenciar la señalización anorexigénica de las señales de saciedad, a través de efectos locales o modulando la actividad de grupos de neuronas hipotalámicas sensibles a leptina que proyectan sobre este núcleo.

En conclusión, aunque el interés por la leptina se centró inicialmente en su acción antiobesidad, hoy en día sabemos que esta señal además de participar en el control de la homeostasis energética juega un papel pleiotrópico en el control de otras funciones fisiológicas como la reproducción, la respuesta inmune, la angiogénesis, la remodelación ósea, y la función cardiovascular. De hecho se ha demostrado la expresión de leptina y/o su receptor en tejidos tan dispares como la placenta (42), el ovario (43), el oviducto (44), el testículo (45), el epitelio mamario (46), la hipófisis (47) y la médula ósea (48). El hecho de que tanto en humanos como en roedores una señalización deficiente de leptina, causada por mutaciones genéticas o por deprivación nutricional severa, esté asociada a defectos en distintas variables inmunológicas, a un retraso en el desarrollo puberal y una inhibición de la competencia reproductiva que son revertidos por el tratamiento con leptina, indican que ésta constituiría una señal metabólica permisiva indicando la disponibilidad energética para el normal desarrollo de estas funciones.

2.2.2. Insulina

El papel de la insulina como un regulador a largo plazo de la ingesta, el balance energético y la adiposidad corporal proporcionando información al hipotálamo sobre el estado de los depósitos energéticos fue ya propuesto a finales del siglo pasado por

Woods y cols. (49). Esta hipótesis fue corroborada por múltiples estudios en humanos, primates y roedores que indicaban que: 1) los niveles basales de insulina son proporcionales a los cambios en masa grasa en respuesta a manipulaciones nutricionales (50) 2) su administración i.c.v o su aplicación intranasal, en concentraciones similares a las presentes en el SNC, disminuye la ingesta de alimentos y el peso corporal (51) .

Esta hormona, es secretada por las células β de los islotes pancreáticos tras la ingesta en función de los niveles de nutrientes en circulación, especialmente glucosa y aminoácidos, de la activación del sistema parasimpático, así como de los niveles de las hormonas incretinas: el polipéptido insulínotropo dependiente de glucosa (GIP) y el péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1), que se liberan en respuesta a la cantidad de alimento (52). La insulina estimula la captación de glucosa al interior celular en los tejidos periféricos sensibles a la misma, como son el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado entre otros. Esto induce el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno en el músculo y en forma de triglicéridos (TAG) en el tejido adiposo. Al aumento del depósito graso inducido por insulina contribuyen sus acciones sobre la captación de los TAG en el tejido adiposo, estimulando la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) e inhibiendo la actividad de la lipasa sensible a hormonas (LSH) (53).

Además de sus acciones metabólicas periféricas, en los últimos años se ha descubierto que insulina juega un papel primordial en la regulación de la homeostasis energética a nivel del SNC, promoviendo la saciedad, aumentando el gasto energético y regulando el metabolismo periférico de glucosa y lípidos. Prueba de ello es que, la delección del receptor de la insulina a nivel central, produce obesidad, insulino-resistencia, hipertrigliceridemia e hiperleptinemia en ratones, aunque más leve que en el caso de la ausencia de receptores de leptina. Además, estos animales mostraban defectos en la espermatogénesis y en la maduración folicular, lo que refleja la participación de insulina también en la regulación de la función reproductiva (54).

La insulina, al igual que leptina, accede al SNC en proporción a sus concentraciones plasmáticas, a través de un sistema de transporte saturable (55). El receptor de insulina se encuentra ampliamente distribuido a nivel hipotalámico, expresándose en los mismos núcleos (ARC, NDM, NVM, AHL y NPV) en los que posteriormente se describió la existencia de poblaciones neuronales sensibles a leptina y donde, al igual que esta hormona, actúa estimulando e inhibiendo la síntesis y liberación de neuropéptidos anorexigénicos y orexigénicos, respectivamente (56). El hecho de que leptina e insulina

activen vías de señalización comunes a nivel hipotalámico, sugiere la existencia de un mecanismo por el cual una hormona pueda potenciar los efectos centrales de la otra sobre la regulación de funciones fisiológicas como la ingesta, el metabolismo periférico y la reproducción (57). En cuanto a la regulación del metabolismo lipídico periférico, objeto de estudio en este trabajo, estudios recientes utilizando modelos de infusión directa de insulina en el hipotálamo mediobasal (que incluye el ARC y el NDM) en ratas o la deficiencia selectiva del receptor de insulina a nivel encefálico en ratones, han demostrado la especial relevancia de la señalización de insulina a nivel central en la regulación del depósito graso. De esta manera, esta hormona actuaría estimulando la lipogénesis e inhibiendo la lipólisis a través de una disminución de la actividad del SNS a nivel del tejido adiposo (58,59).

2.2.3. Ghrelina

La ghrelina, identificada como ligando endógeno para el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (60) es una hormona sintetizada fundamentalmente por el estómago. Sin embargo, también se ha detectado su expresión, en niveles muy bajos, en otros tejidos como el hipotálamo (61), hipófisis (62), intestino (63), placenta (64), páncreas (65), hígado y gónadas entre otros (66).

Aparte de sus acciones reguladoras de la secreción de GH, esta hormona podría considerarse como un indicador de insuficiencia energética dado que sus niveles circulantes dependen del estado nutricional (aumentado por el ayuno y disminuido tras la ingesta de alimentos), además de correlacionar negativamente con el contenido de grasa corporal. De manera que, individuos obesos presentan bajos niveles plasmáticos de ghrelina (67) que se elevan tras la pérdida de peso (68). Por otro lado, esta hormona, es el único factor circulante descrito con propiedades orexigénicas. Así, tanto su administración central como periférica en ratas, estimula marcadamente la ingesta y el depósito graso, revirtiendo incluso el efecto anorexigénico de la leptina. Las acciones antagónicas de ghrelina y leptina en la regulación de la ingesta a nivel central se fundamentan en los efectos opuestos de ambas sobre la actividad de sus circuitos hipotalámicos diana a nivel del núcleo ARC (neuronas productoras de NPY/AgRP y POMC) y sobre la expresión del receptor de ghrelina en este núcleo (SGH-R1a) (69,70). Sin embargo, ghrelina promueve el desarrollo de adiposidad no sólo a través de sus acciones orexigénicas sino también regulando el metabolismo lipídico periférico (71). De este modo, la administración crónica de ghrelina i.c.v. en rata, promueve la

captación de triglicéridos y la síntesis de novo de ácidos grasos, mientras que inhibe la oxidación de los mismos en el tejido adiposo e hígado (72). En el caso del tejido adiposo, estos efectos de ghrelina son independientes de su modulación de la ingesta (73) y de la secreción de hormona de crecimiento (74,75). De acuerdo con estos datos ratones deficientes en esta hormona a pesar de no mostrar diferencias en cuanto a ingesta, peso o contenido de grasa corporal, respecto a sus controles de genotipo salvaje, cuando son alimentados con dieta estándar, presentan un fenotipo metabólico claro cuando son expuestos a dieta rica en grasa. En esta situación, estos animales muestran desde una edad temprana, una menor ganancia de peso y depósito de grasa debido a un incremento del gasto energético y de la actividad locomotora, sin cambios en la tasa de ingesta (76). Este fenotipo es más severo y evidente, ya en dieta estándar, cuando se elimina por completo la señalización de ghrelina a través de la delección simultánea tanto de la hormona como de su receptor (77).

2.3 Otras señales de adiposidad: las adipocitoquinas

El concepto tradicional del tejido adiposo, como un mero almacén de energía en forma de triglicéridos, se ha visto modificado a lo largo de los últimos años al ponerse de manifiesto que este actúa como un órgano endocrino extraordinariamente activo, produciendo y secretando una gran variedad de moléculas multifuncionales, denominadas colectivamente adipocitoquinas (78). Desde el descubrimiento de la leptina en 1994, la lista de péptidos bioactivos sintetizados y secretados por el tejido adiposo (79), que participan en la regulación de distintas funciones fisiológicas y especialmente en la modulación del metabolismo energético y la respuesta inmune, ha crecido considerablemente (80). Esta larga lista incluye entre otras, proteínas como, adiponectina, resistina y citoquinas pro-inflamatorias como: IL-6, IL-1 y TNF α (tabla 1). Sin embargo estos factores no muestran un patrón de expresión restringido al tejido adiposo. De hecho, en los últimos años se ha venido consolidando el concepto de obesidad como un estado de inflamación crónica con alteración de la producción, tanto local (tejido adiposo, hipotálamo, hígado y músculo) como sistémica, de diversas adipocitoquinas que podría determinar la aparición de los cambios metabólicos adversos característicos de esta patología (81).

Adipocitoquina	Función metabólica y participación en la inflamación	Referencias
Adiponectina	Efecto antiinflamatorio. Favorece sensibilidad a la insulina en músculo e hígado.	Véase apartado 2.3.1
Apelina	Participa en la regulación de la ingesta, el gasto energético y el equilibrio hemodinámico. Inhibe la secreción pancreática de insulina. Aumenta en obesidad e inflamación. Posible efecto de compensación anti-inflamatorio	Lago F y cols. 2007; Castan-Laurell I y cols. 2011
Amioloide sérico A	Mediador del proceso inflamatorio en tejido adiposo, participando en el reclutamiento de macrófagos, estimulando la producción de otros factores pro-inflamatorios y la lipólisis.	Olsson M y cols. 2011
ASP (proteína estimuladora de la acilación)	Producto de la proteólisis parcial de la proteína C3 del sistema alternativo de complemento. Estimula la lipogénesis en tejido adiposo e inhibe la captación y oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético. Efectos anoréticos a nivel central.	Roy C y cols. 2011
IL-1	Importante mediador de inflamación Participación en la regulación de la homeostasis energética	Véase apartado 2.3.4.1
IL-6	Efectos pleiotrópicos en gran variedad de tejidos. Función pro y anti-inflamatoria	Véase apartado 2.3.4.2
Leptina	Proteína pleiotrópica. Regula homeostasis energética y estimuladora de la respuesta inmune.	Véase apartado 2.2.1
Lipocalina-2	Unión y transporte de moléculas lipofílicas. Función pro-inflamatoria induciendo la acumulación tisular de productos intermedios del metabolismo lipídico y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias. Marcador de inflamación relacionado con obesidad y resistencia a insulina.	Yan QW y cols. 2007
MCP-1	Participa en el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo y en consecuencia en el proceso inflamatorio que induce resistencia a la insulina	Yadav A y cols. 2010
Osteopontina	Proteína con funciones quimiotácticas relacionada con el proceso de inflamación asociado a la obesidad y la resistencia a la insulina. Estimulador de la acumulación y producción hepática de triglicéridos	Keifer FW. y cols. 2011
RBP4 (Proteína transportadora de retinol tipo 4)	Posible inhibidor de la sensibilidad a la insulina en tejido adiposo, hígado y músculo. Correlación positiva con marcadores de inflamación.	Kovacs P. y cols. 2007; Henze A y cols. 2008
Resistina	Inhibe adipogénesis. Predictor de enfermedad coronaria en humanos. Efecto pro-inflamatorio.	Véase apartado 2.3.2
TNF α	Induce resistencia a insulina, anorexia y caquexia. Efecto pro-inflamatorio.	Véase apartado 2.3.3
Vaspin	Efecto insulino-sensibilizante en situaciones de obesidad. Efecto anorético central. Inhibidor del proceso inflamatorio asociado a obesidad reduciendo el estrés oxidativo y la síntesis de proteínas quimiotácticas.	Phalitakul S y cols, 2011; Kloting N y cols, 2011
Visfatina	Inicialmente considerado como factor insulino-mimético Marcador pro-inflamatorio del tejido adiposo asociado con resistencia sistémica a la insulina e hiperlipidemia.	Fukuhara A y cols. 2007

Tabla 1. Distintas adipocitoquinas implicadas en la regulación del metabolismo energético y la respuesta inmune.

A nivel hipotalámico, la activación de esta señalización inflamatoria genera resistencia a las acciones anorexigénicas, termogénicas y metabólicas de leptina e insulina, al bloquear las vías de señalización comunes de estas hormonas, facilitando de esta manera el desarrollo de obesidad. Por el contrario, en algunas situaciones patológicas con balance energético negativo, como ocurre en ciertas patologías de tipo infeccioso, el aumento de la producción hipotalámica de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF α constituye un mediador esencial, no sólo en la disminución de la ingesta, sino también en la activación de la termogénesis característica de este tipo de estados (81).

Algunas de estas adipocitoquinas también pueden participar en la modulación del metabolismo, la homeostasis energética y la adiposidad en situaciones no patológicas (82). Así durante la gestación, modelo fisiológico de desequilibrio energético estudiado en este trabajo y caracterizado por un incremento de las reservas grasas, se observa una elevación de los niveles sistémicos de leptina, resistina y adiponectina, además de algunas citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6 o TNF- α (83) cuyo papel en la regulación de la homeostasis energética se resume a continuación.

2.3.1 Adiponectina

La adiponectina es una proteína sintetizada principalmente por el tejido adiposo cuyos niveles plasmáticos correlacionan negativamente con el contenido de grasa corporal, al contrario de lo que ocurre con otras adipocitoquinas (84). Así, los niveles de adiponectina disminuyen en individuos obesos mientras que se ven incrementados tras la pérdida de peso (85). La adiponectina actúa de forma autocrina en el tejido adiposo promoviendo la proliferación y diferenciación de los adipocitos, a través de la estimulación de la expresión de genes implicados en el proceso de adipogénesis, y aumentando contenido lipídico y la respuesta a la insulina de las células adiposas (86). Por otro lado, la administración i.c.v de adiponectina en roedores, induce una disminución del peso corporal causada por una estimulación del gasto energético y la oxidación de ácidos grasos sin afectar a la ingesta (87), además de mejorar el metabolismo hidrocarbonado atenuando la resistencia a la insulina causada por la obesidad (88). Además a nivel periférico, la adiponectina inhibe la síntesis hepática de glucosa y estimula la expresión de su transportador (GLUT-4) a nivel del músculo esquelético (89,90). Ambos mecanismos, central y periférico, podrían ser los responsables de los efectos beneficiosos de la adiponectina sobre la homeostasis de la glucosa. De este modo, estudios realizados en humanos muestran que los niveles

plasmáticos de adiponectina se correlacionan positivamente con la sensibilidad a la insulina (91). En apoyo de estos datos experimentales, los ratones deficientes en adiponectina, aunque no muestran alteraciones fenotípicas significativas bajo una dieta estándar, presentan una menor sensibilidad a la insulina al ser sometidos a una dieta rica en carbohidratos (92).

2.3.2 Resistina

Resistina es una adipocitoquina secretada principalmente por adipocitos en roedores, mientras que en humanos, su principal fuente de producción son las células mononucleares (93,94). Estudios realizados en roedores, han demostrado su expresión además en el núcleo arcuato hipotalámico, en la hipófisis, en el tejido adiposo marrón, el tracto gastrointestinal, el músculo esquelético, la glándula adrenal y los testículos (95-98). En roedores, la secreción de resistina es dependiente del estado nutricional y metabólico encontrándose sus niveles circulantes elevados en animales obesos, y disminuyendo de manera significativa tras el ayuno (99). Desde su descubrimiento en 2001 fue considerada como la hormona que relacionaba la obesidad con el desarrollo de diabetes, debido a su patrón de expresión en roedores y al hecho de que su producción estuviese incrementada en modelos murinos de obesidad y diabetes. Sin embargo aunque su función en humanos no está del todo esclarecida, se ha demostrado que en ratones deficientes en resistina, expuestos a dieta rica en grasas, la inducción de la expresión de resistina en macrófagos disminuye la sensibilidad a la insulina como consecuencia del desarrollo de un estado inflamatorio acompañado de un aumento de la lipólisis y de los niveles séricos de ácidos grasos libres (100). Además, la neutralización de resistina, mediante la administración de inmunoglobulina- γ anti-resistina, provoca una disminución significativa de los niveles de glucosa plasmática en animales con obesidad inducida por la dieta (93).

A nivel central resistina reduce la ingesta (101) y modula el metabolismo lipídico periférico de manera dependiente del estado nutricional afectando a diferentes tejidos (99). Así, en condiciones basales la acción central de resistina induce la expresión hepática de enzimas implicadas en la síntesis de novo de ácidos grasos, mientras que en condiciones de ayuno su administración i.c.v. actúa a nivel del tejido adiposo generando la misma respuesta. Sin embargo, la administración central de resistina inhibe la oxidación de ácidos grasos tanto en hígado como en tejido adiposo de manera

independiente del estado nutricional. Estos resultados, sugieren que en general la acción central de resistina reduce la movilización lipídica y promueve la adiposidad (102).

Por último, además de los efectos sobre el metabolismo lipídico periférico, los efectos centrales de resistina incluyen la inducción de resistencia hepática a la insulina (103). Todos estos datos sugieren que resistina ejerce una acción importante en la regulación de la homeostasis energética modulando además de la ingesta, tanto el metabolismo de los hidratos de carbono como el metabolismo lipídico.

2.3.3. Factor de necrosis tumoral (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina pro-inflamatoria secretada principalmente por los macrófagos que se expresa además en monocitos, linfocitos, tejido adiposo y músculo (104). TNF- α participa en la regulación de múltiples procesos biológicos como la respuesta inmune, la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y el metabolismo energético a través de su interacción con sus receptores tipo I y II (105). Esta citoquina fue identificada como un mediador esencial del estado de caquexia, reducción patológica de la masa muscular y adiposa, causada por diferentes procesos infecciosos y cáncer. El hecho de que la expresión de TNF α se encontrase aumentada en el tejido adiposo de modelos murinos de obesidad y diabetes tipo II constituyó el primer hallazgo que relacionaba obesidad con inflamación sistémica y desarrollo de resistencia a la insulina. Además, la neutralización con anticuerpos de TNF- α en distintos modelos de obesidad en roedores, produce un aumento de la captación periférica de glucosa dependiente de insulina (106) y la deficiencia de TNF α en el ratón previene el desarrollo de resistencia a insulina inducida por la alimentación con dieta rica en grasas (107). TNF- α interviene en el metabolismo de la glucosa a nivel del tejido adiposo induciendo un estado de resistencia a la insulina en los adipocitos (108), a través de distintos mecanismos: 1) mediante la inhibición de la expresión proteica del receptor de insulina, del sustrato-1 del receptor de insulina, y del transportador de glucosa GLUT-4 y 2) inhibiendo la autofosforilación y la actividad del receptor de insulina (IR) y de su sustrato IRS-1 y 3) inhibiendo factores de transcripción implicados en la diferenciación celular, la lipogénesis y la sensibilidad a la insulina (109). Sin embargo, estudios in vitro sugieren que, TNF- α puede desarrollar efectos diabetogénicos indirectos en el tejido adiposo al promover la lipólisis e inhibir la lipogénesis y la diferenciación adipocitaria lo que conduce al desarrollo de dislipemia

(110). Como consecuencia, el exceso crónico de ácidos grasos libres en suero provoca un incremento del estrés oxidativo, la disfunción de orgánulos como la mitocondria o el retículo endoplasmático y una estimulación de vías señalización inflamatoria (JNK-AP1 e IKK-NFK- β) (111) que en conjunto ejercen un efecto deletéreo sobre la sensibilidad a la insulina (111,112). Estos datos llevaron a proponer a TNF- α como uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria en obesidad y la relación de esta última con el desarrollo de diabetes (Fig.2).

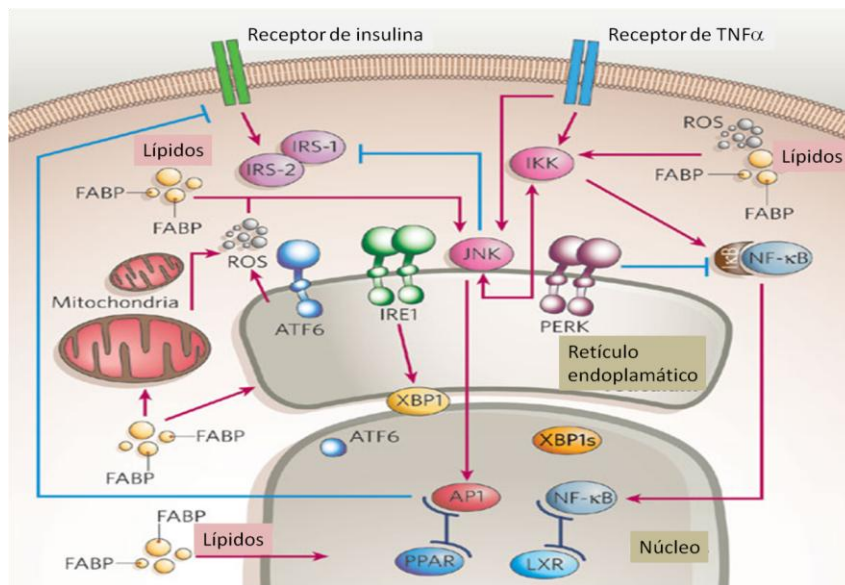


Figura 2. Vías de señalización que relacionan TNF con resistencia a insulina. Modificada de Hotamisligil G.S, 2006, Nature; 444, 860-867

2.3.4. Interleuquinas

El término interleuquina fue aplicado inicialmente a un grupo de citoquinas sintetizadas por diversas células del sistema de defensa que, actuando como moléculas de señalización de naturaleza proteica, participaban en la regulación funcional de la respuesta inmune, tanto a nivel local como sistémico. Sin embargo, esta definición quedó pronto obsoleta al demostrarse que muchos de estos factores también podían ser producidos por tejidos y órganos no pertenecientes al sistema inmune donde ejercen múltiples funciones entre las que se encuentra la regulación de la ingesta, el metabolismo y la homeostasis energética en general. Así, como ya se ha mencionado con anterioridad la producción de interleuquinas pro-inflamatorias como IL-6 o IL-1 se encuentra aumentada en órganos y tejidos de relevancia metabólica en respuesta a situaciones patológicas de desbalance energético (113).

2.3.4.1 Interleuquina-1 (IL-1)

IL-1, descubierta originalmente como un factor secretado por macrófagos activados, capaz estimular la proliferación y activación de linfocitos B y T, constituye un importante mediador de inflamación aunque también es producido por gran variedad de tipos celulares actuando como un modulador del sistema neuro-inmuno-endocrino. Su administración central da lugar al desarrollo de estados febriles y suprime el apetito, efectos característicos de un proceso infeccioso o inflamatorio (114,115).

El sistema IL-1 está constituido por dos isoformas, IL-1 α y β , codificadas por dos genes independientes que ejercen funciones similares cuando se unen a la forma activa de su receptor (IL-1RI). Sin embargo, la interacción de ambos ligandos con la forma inactiva de su receptor, IL-1RII, bloquea cualquier respuesta biológica (116). Por último otro miembro de este sistema es el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), proteína circulante cuya unión al receptor IL-1RI no genera una respuesta intracelular, antagonizando por tanto los efectos celulares de IL-1 α y β .

Existen numerosas evidencias que demuestran la implicación del sistema de IL-1 en la regulación de la homeostasis energética. Así, tanto en humanos como en roedores el antagonista del receptor IL-1Ra se expresa en el tejido adiposo, donde se sobreexpresa en estados de obesidad, en los cuales se elevan también los niveles séricos de esta proteína, que correlacionan con los niveles circulantes de leptina (117,118). De hecho, inicialmente se consideró a IL-1 como un mediador esencial de los efectos anoréticos de leptina en condiciones fisiológicas, basándose en el hecho de que esta hormona induce la expresión de IL-1 en el hipotálamo y los ratones deficientes en IL-1RI son parcialmente resistentes a los efectos supresores de la ingesta que ejerce la leptina (119,120). Posteriormente, se demostró que la sobre-expresión central de IL-1Ra en ratas no afecta la ingesta, aunque si bloquea los efectos anoréticos de la leptina, lo que llevó a concluir que la señalización hipotalámica de IL-1 es esencial para los efectos farmacológicos de la administración de esta hormona (121).

De hecho, en los ratones deficientes IL-1 RI no se observan cambios en el patrón de ingesta aunque presentan un marcado incremento del depósito lipídico. Este fenotipo es consecuencia de una menor sensibilidad a la leptina, junto a una menor oxidación de las grasas y una menor actividad locomotora, lo que justificaría el desarrollo de obesidad de estos animales en la etapa adulta (120). Sin embargo, el exceso de señalización de IL-1 en el ratón, como consecuencia de la delección del antagonista del receptor, resulta en

un fenotipo delgado y de resistencia al desarrollo de obesidad inducida por la dieta en el que tampoco se observan alteraciones en la ingesta (122). Por otro lado, datos *in vitro* sugieren que el efecto antiobesogénico de esta citoquina puede ser debido a sus acciones directas sobre el tejido adiposo, ya que el tratamiento con IL-1 inhibe la adipogénesis en preadipocitos (123) y suprime la actividad de LPL en adipocitos maduros. Se ha postulado que además de su papel en la modulación del metabolismo lipídico, IL-1 podría regular el metabolismo de los carbohidratos, aunque su participación en este proceso no está del todo esclarecida. Por un lado, tras la administración intraperitoneal de IL-1 en ratas, tiene lugar un aumento de la sensibilidad a la insulina (124). Apoyando estos datos, ratones maduros deficientes en IL1RI alimentados con dieta estándar presentan elevados niveles séricos de insulina una vez desarrollado el fenotipo obeso (117) y ratones deficientes en IL-1Ra son hipoinsulinémicos además de mostrar una elevada sensibilidad a la insulina (118). Por el contrario recientemente en ensayos clínicos el tratamiento con IL-1Ra (Anakinra®) mejoraba la glucemia y la función secretora de las células beta pancreáticas, coincidiendo con una reducción de la inflamación sistémica, en pacientes con diabetes tipo II (125). Además se ha sugerido que la deficiencia en IL-1RI en el ratón aunque favorece el incremento de depósito graso, protege frente al desarrollo de resistencia a la insulina causada por la alimentación con dieta rica en grasa (126).

2.1.1.1 Interleuquina-6 (IL-6)

Interleuquina-6 es una citoquina multifuncional que modula una gran variedad de procesos fisiológicos como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular, y la apoptosis. Esta citoquina además, participa en la regulación del sistema inmune, del sistema hematopoyético y de la respuesta inflamatoria; ejerciendo además múltiples efectos sobre diversos tejidos, órganos y sistemas como el sistema nervioso y endocrino, y modulando entre otros el metabolismo óseo, el desarrollo embrionario y la función reproductora (127).

En la década de los años setenta el creciente interés en el campo de la inmunología por la identificación de factores, que producidos por las células T estimuladas, cooperasen con las células B induciendo la síntesis de anticuerpos, condujo a la identificación de una serie de factores denominados genéricamente TRFs (factores que reemplazan a la células T). En este contexto, en una serie de estudios consecutivos Hirano y cols. identificaron un péptido que, por sus potentes acciones como factor de crecimiento y

diferenciación de las células B, fue denominado inicialmente BCDF-II ó TRF-2 (factor de diferenciación II de células B) y, posteriormente renombrado como BSF-II (factor estimulador II de células B), por ser un potente estimulador de la síntesis de inmunoglobulinas por células B en cultivos de linfoblastos humanos transformadas por el virus Epstein-Barr (128). Paralelamente otros dos grupos de investigación identificaron factores con propiedades similares en cultivos de fibroblastos (129) y células endoteliales humanas (130) estimulados con mediadores inflamatorios. Más tarde, la clonación y caracterización del ADN que codificaba estos factores permitía determinar que se trataba de la misma proteína que recibió desde ese momento la designación genérica de IL-6 (131).

La IL-6 humana es una glicoproteína 184 a.a., cuyo peso molecular oscila entre 21 a 28 kDa dependiendo del grado de glicosilación y fosforilación, y es codificada por un gen ubicado en el brazo corto del cromosoma 7 (132). En el ratón esta proteína tiene una longitud de 187 a.a., conserva un 42% de homología respecto a la forma humana y contiene mayor número de lugares de glicosilación. IL-6 posee una estructura helicoidal que comparte similitudes con otras citoquinas como IL-1, factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), oncostatina M y cardiotrofina-1, que juntas conforman la superfamilia de las citoquinas de la IL-6 (133).

Esta citoquina pro-inflamatoria, además de ser producida por células del sistema inmune, se expresa en diferentes tejidos y tipos celulares como las células endoteliales, células de la glía, fibroblastos, tejido muscular, tejido adiposo, o el hipotálamo (134). IL-6 actúa como una señal de alarma sistémica indicando la presencia de daño tisular que puede ser activada en respuesta a múltiples estímulos. De hecho, se han identificado un amplio número de regiones reguladoras en el promotor de su gen que le confieren capacidad de respuesta a diferentes estímulos, entre las que se encuentran elementos de respuesta a AMPc, el factor nuclear NF κ B, glucocorticoides y diversas citoquinas (135). Así, IL-6 se produce y secreta generalmente en respuesta a estímulos no específicos como factores bacterianos (LPS), citoquinas como IL-1, y TNF α , (136), y como consecuencia de la estimulación β -adrenérgica (137). Por el contrario los niveles de ARNm de IL-6 son inhibidos entre otros factores por glucocorticoides (138) y estrógenos (139).

Receptor de IL-6

IL-6 ejerce sus funciones biológicas a través de la unión a su receptor (140) que consiste en un complejo formado por dos glicoproteínas diferentes: una subunidad de unión al ligando de 80 kDa (gp80 o IL-6R α) y una subunidad de 130 kDa (gp130), responsable de la transducción de la señal intracelular (141). La subunidad gp130, presente en casi todas las células del organismo, es común para todas las citoquinas de la familia de IL-6, hecho que les confiere una marcada redundancia funcional (142). A pesar de que la expresión de gp130 es prácticamente ubicua el número de células que responden a esta citoquina es limitado, debido a que la expresión de la subunidad alfa es más restringida, siendo predominante en hepatocitos y poblaciones leucocitarias como monocitos, neutrófilos y células T y B. Sin embargo, también se ha demostrado su expresión en otros tejidos no directamente relacionados con la función inmune como el tejido adiposo y el músculo esquelético (143,144), además de glándulas endocrinas como la hipófisis y la corteza adrenal (145). Así, la función de la subunidad alfa es convertir a las células en sensibles a IL-6 de tal manera que esta citoquina no es capaz de unirse a gp130 en su ausencia. Por tanto, la señalización de IL-6 se lleva a cabo a través de la unión de ésta a IL-6R α y la posterior dimerización de gp130 con este complejo ligando-receptor. IL-6R α y gp130 pertenecen a la familia de receptores de citoquinas clase I, a la que también pertenecen los receptores de hormonas como prolactina, hormona de crecimiento y leptina (127).

Otra de las peculiaridades del sistema de señalización de IL-6 es la existencia de variantes solubles de ambas subunidades del receptor - sIL-6R α y sgp130 - que generadas bien por proteólisis de la isoforma anclada a la membrana, o bien por procesamiento alternativo de su ARNm, modulan la actividad biológica de IL-6 ejerciendo efectos agonistas y antagonistas respectivamente. Así, sIL-6R α es capaz de acoplar IL-6 a gp130, induciendo su señalización en células que carecen de la isoforma anclada a la membrana (140,146). Por su parte, la forma soluble de gp130 inhibe los efectos de IL-6 mediados por sIL-6R α (147).

Mecanismos de señalización de IL-6

Tras la unión de IL-6 a IL-6R α y gp130, éste se homodimeriza para dar lugar a la formación de un complejo hexamérico (148). Aunque gp130 no posee actividad quinasa intrínseca contiene en su dominio citoplasmático los motivos Box 1 y 2, altamente conservados en los receptores de citoquinas clase I, que le permiten asociarse a los

miembros de la familia de tirosina quinasas citoplasmáticas JAK (Jano quinasa), concretamente a JAK-1, JAK-2 y Tyk-2. La dimerización del complejo ligando-receptor induce un cambio conformacional que se traduce en la transactivación por fosforilación de las proteínas JAK, que a su vez fosforilan y activan a dos proteínas de la familia STAT de factores de transcripción, fundamentalmente STAT-3, y en menor medida STAT-1. Por último estas proteínas, una vez activadas, dimerizan y se traslocan al núcleo para inducir la expresión de sus genes diana que codifican entre otras, proteínas efectoras relacionadas con la respuesta inmunitaria e inflamatoria, distintos factores de transcripción y miembros de la familia de supresores de la señalización de citoquinas SOCS. Una vez que tiene lugar la estimulación celular la función predominante de las proteínas SOCS es atenuar los efectos biológicos inducidos por las citoquinas al inhibir la fosforilación de STAT. Aunque existen ocho proteínas dentro de la familia SOCS, SOCS-3 y SOCS-1, que presentan una mayor relación funcional, son las que ejercen un efecto inhibitor más potente sobre la señalización de IL-6 (149).

Además de esta señal específica de STAT, la activación de gp130 en respuesta a IL-6 también puede dar lugar al reclutamiento y activación de la tirosin fofatasa SHP-2 que actúa como intermediario en la puesta en marcha de las vía ras/MAPKs (quinasas activadas por mitógenos) y PI3K/AKT/mTOR (fosfatidilinositol-3-quinasa) ambas cruciales para la proliferación y supervivencia celular. Esta última cascada de señalización supone un mediador esencial de las acciones, tanto a nivel central como periférico, de distintas señales esenciales en la regulación del metabolismo energético como leptina e insulina (150,151) (Fig. 3).

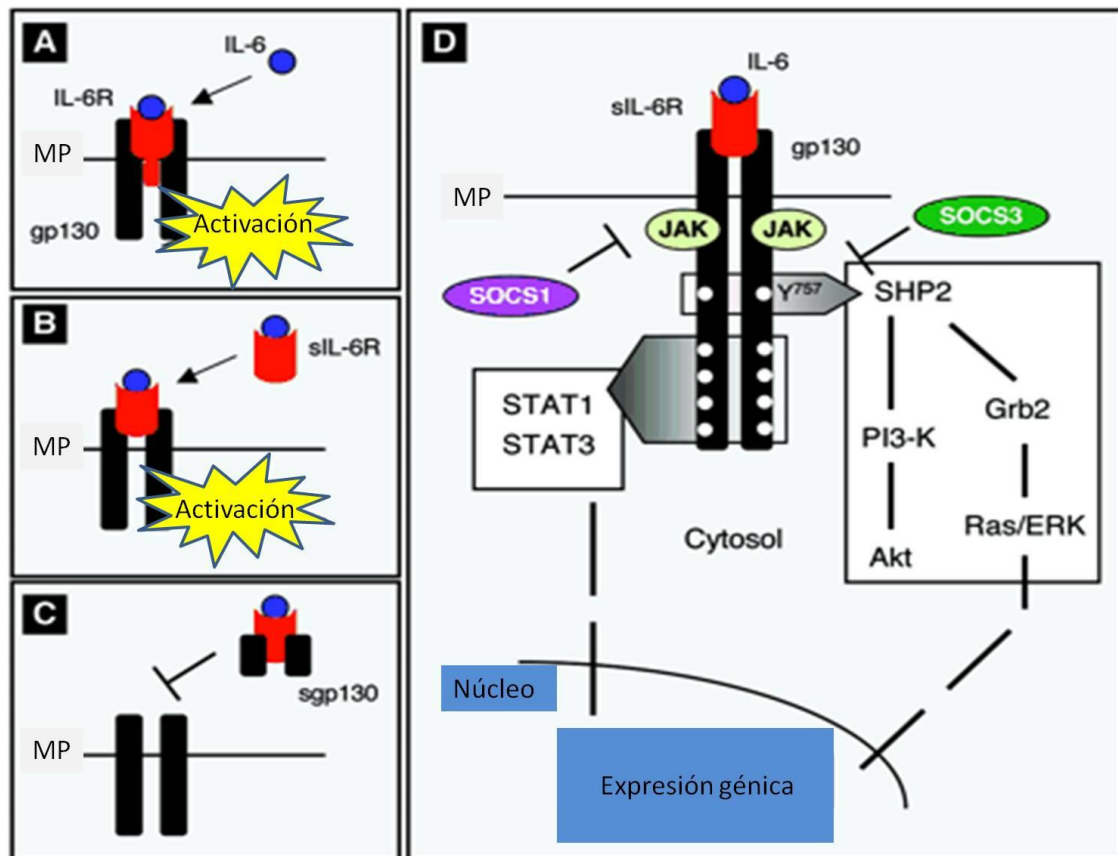


Figura 3. Vías de señalización de IL-6. Imagen tomada y modificada de Jones S.A, *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 3463-3468

IL-6 como regulador de la homeostasis energética

Las primeras evidencias de la implicación de IL-6 en la modulación de la homeostasis energética surgieron de la observación de que esta citoquina era producida y secretada por el tejido adiposo y de que sus niveles plasmáticos correlacionaban positivamente con el Índice de Masa Corporal (IMC) de manera similar a lo que ocurre con otras señales de adiposidad como la leptina. De hecho, en condiciones basales, en ausencia de inflamación y de ejercicio físico, aproximadamente un 30% de la IL-6 que se libera a la circulación proviene del tejido adiposo (152), mientras que, la pérdida de peso provocaba una disminución en los niveles plasmáticos de IL-6 en personas obesas (153). Además, tanto IL-6 como su receptor se expresan, además de en el tejido adiposo (154), en otros tejidos relacionados con el metabolismo energético, como el hígado, el músculo esquelético (155) y el hipotálamo (156).

El descubrimiento de que la ausencia de IL-6 en ratón daba lugar al desarrollo de obesidad en la edad adulta, fenotipo parcialmente revertido por la administración

periférica de IL-6 parecía confirmar su papel como señal clave en los mecanismos de control del peso corporal (157). En esta línea, la administración i.c.v. de IL-6 en ratas disminuye el peso y el contenido de grasa corporal principalmente incrementando el gasto energético (158) y en menor medida mediante una disminución de la ingesta.

En humanos, los niveles de IL-6 en el líquido cefalorraquídeo (LCR), se correlacionan negativamente con el peso corporal y con el contenido de grasa, lo que sugiere que la obesidad estaría relacionada con una deficiencia central de IL-6, que afectaría a la homeostasis energética (159). Los bajos niveles de IL-6 en líquido cefalorraquídeo de pacientes obesos podrían ser debidos bien a un defecto en su transporte a través de la barrera hematoencefálica, como ocurre con leptina, o bien a una disminución en la producción astrocitaria y neuronal de esta citoquina. En apoyo de esta segunda hipótesis, se ha demostrado que la elevación aguda de los niveles plasmáticos de IL-6, provocada por el ejercicio intenso no afecta, a su concentración en el LCR que permanece constante (160).

En este contexto, múltiples estudios han abordado la asociación entre diferentes polimorfismos en el promotor de gen de IL-6 y el incremento de adiposidad en humanos (134,161-167). Uno de los más estudiados, aunque con resultados contradictorios, es el polimorfismo -174G> C caracterizado por la presencia de unas concentraciones muy bajas de IL-6 en plasma. Inicialmente diversos autores demostraron la correlación entre la incidencia de esta variante en humanos con un aumento del IMC, un mayor contenido de grasa y un menor gasto energético y sensibilidad a la insulina (161,162,164,167). Sin embargo, en dos trabajos recientes, la asociación de este polimorfismo con el IMC no fue significativa tras la aplicación de una revisión sistemática mediante metaanálisis de los resultados disponibles en una cohorte de aproximadamente 30000 individuos (165,166). Por el contrario un tercer estudio, utilizando la misma metodología, en el que además de ésta se analizaron variantes génicas de otros factores implicados en la regulación de la homeostasis energética, mostró una correlación positiva entre el polimorfismo -174G> C y el desarrollo de obesidad en humanos. Una explicación de esta discrepancia podría ser la existencia de otros polimorfismos funcionales, aún desconocidos, que en combinación podrían influenciar la transcripción del gen de IL-6 (168).

A lo largo de la última década, el estudio de la función reguladora de IL-6 sobre diferentes vías metabólicas ha recibido especial atención a medida que se ha ido consolidando la idea de obesidad como un estado de inflamación y tras ser postulada,

junto con otras citoquinas pro-inflamatorias, como uno de los principales mediadores del desarrollo de resistencia a la insulina en la obesidad.

Un concepto emergente en estos estudios es la clara división entre los efectos centrales y periféricos de esta citoquina, así como la divergencia en su actuación en los diferentes tejidos diana. Así, los efectos anoréticos de IL-6 a nivel central parecen ser dependientes de la duración del tratamiento. En concreto, la administración i.c.v en ratas de esta citoquina disminuye la ingesta a corto plazo (2h) mientras que, si el tratamiento se prolonga durante varios días, este efecto desaparece cuando son alimentadas con dieta estándar o bien es atenuado bajo condiciones de alimentación hipercalórica (158). De acuerdo con estos datos, tanto la deficiencia de IL-6 como su sobre-expresión a nivel central mediante transgénesis condicional en ratones (169) o administración de adenovirus en ratas (170), no afecta la ingesta a largo plazo pero si el gasto energético y el metabolismo basal. De hecho, sólo la delección conjunta de IL-6 e IL-1 en ratones resulta en un fenotipo hiperfágico, (171) lo que sugiere un efecto aditivo de ambas citoquinas sobre la ingesta. A este respecto, recientemente se ha descrito que un incremento en la producción de IL-6 hipotalámica en respuesta al ejercicio ejerce un efecto potenciador de los efectos anoréticos de leptina e insulina provocando una mayor sensibilidad a las mismas (172). Por el contrario y complicando todavía más la interpretación de los acciones de esta citoquina sobre esta función a nivel central, se ha demostrado que IL-6, junto con TNF α e IL-1, es un mediador inflamatorio esencial en el desarrollo de la resistencia a leptina e insulina a nivel hipotalámico como resultado de la alimentación con dieta rica en grasas (173).

El estudio del papel de IL-6 como regulador central del gasto energético ha ofrecido resultados más consistentes. Como ya se ha comentado, la administración i.c.v de IL-6 en ratas disminuye el peso y la adiposidad corporal incrementando el consumo de oxígeno, mediante la activación de la inervación simpática del tejido adiposo marrón, con el consecuente aumento de la proteína desacoplante UCP-1 (158). De acuerdo con estos datos, la ausencia de IL-6 en el ratón lleva asociada una disminución de la termogénesis inducida por la exposición al frío (174). Apoyando esta hipótesis, recientemente se ha demostrado que IL-6R α se co-expresa con los principales péptidos moduladores de la actividad del SNS a nivel del núcleo paraventricular hipotalámico (175).

El estudio de las acciones metabólicas periféricas de IL-6 ha resultado igualmente complejo debido al incremento de su producción local en tejidos como el músculo, el

hígado o el tejido adiposo en respuesta a múltiples estímulos (ejercicio, inflamación y sepsis) pudiendo ejercer funciones tanto endocrinas, como paracrinas o autocrinas en estos tejidos.

En condiciones de reposo y en ausencia de inflamación el tejido adiposo es una fuente importante de IL-6, contribuyendo de manera significativa a la concentración total de esta citoquina en plasma. Sin embargo, la concentración intersticial de IL-6 en el tejido adiposo es 100 veces superior a la presente en circulación (176), lo que implica que esta citoquina puede actuar como un importante regulador autocrino/paracrino en este tejido. En este sentido, diversos estudios indican que IL-6 actúa inhibiendo la captación y síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo, así como estimulando la oxidación de ácidos grasos (177-183). El proceso de captación de ácidos grasos en el adipocito es inhibido en respuesta a la administración de IL-6 tanto en humanos como en roedores, como consecuencia de una disminución de la actividad de LPL (178). Por otro lado, IL-6 estimula la lipólisis en adipocitos humanos en cultivo, induciendo la elevación de los niveles de ARNm de LHS, sin afectar su actividad (178). De acuerdo con estos resultados, la administración de IL-6 en humanos provoca un incremento de los niveles de ácidos grasos libres y de la oxidación de las grasas (179). Por el contrario, la producción de la proteína ASP, enzima que media la síntesis de triglicéridos a partir de diacilglicéridos en el tejido adiposo, se encuentra elevada en ratones deficientes en IL-6 antes y después del desarrollo de obesidad (180). Además, se ha descrito que la administración de IL-6 en ratas induce un aumento en la síntesis y fosforilación en tejido adiposo de la enzima AMPK, cuya función como ya mencionamos es importante para restablecer los niveles energéticos celulares mediante la estimulación de la oxidación de ácidos grasos entre otras acciones. En consecuencia, se ha sugerido que, la disminución de la actividad de AMPK observada en ratones preobesos deficientes en IL-6 podría contribuir al desarrollo de obesidad en este modelo (184,185). Otra prueba del importante papel de esta citoquina en la regulación de la adiposidad es la marcada inhibición del depósito graso en ratones transgénicos que co-expresan IL-6 y su receptor soluble (186).

En cuanto al papel de IL-6 en la regulación del metabolismo de la glucosa a nivel del tejido adiposo y hepático, sus acciones aparentemente contradictorias parecen ser dependientes de la magnitud y duración del estímulo (187-195). Por un lado varios estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la administración aguda de IL-6, o bien no tiene efecto sobre la sensibilidad a la insulina en hígado y tejido adiposo (189), o

bien estimula la captación de glucosa por este último (188). Por el contrario, los niveles de IL-6 en plasma y su expresión en el tejido adiposo están incrementados en pacientes con obesidad y diabetes tipo II, correlacionándose con el grado de resistencia a la insulina (189). Así, estudios en adipocitos en cultivo (190) demuestran un efecto inhibidor de IL-6 sobre la captación de glucosa inducida por insulina al reducir la expresión IRS-1 y GLUT-4 (191). La administración crónica de IL-6 en roedores, que resultaba en niveles similares a los presentes en obesidad, provoca una disminución de la síntesis de glucógeno inducida por insulina como consecuencia de la reducción de la fosforilación del receptor de insulina y de IRS-1 (192). Esta inhibición de la vía de señalización hepática de insulina es probablemente debida a la estimulación de la producción de SOCS- 3 (193).

Otra fuente de controversia acerca de las acciones metabólicas de IL-6 a nivel hepático surge de dos recientes trabajos en los que se demuestra que la deficiencia global de IL-6 o de su receptor a nivel hepático se traduce en una resistencia sistémica a la acción de la insulina mediado por el desarrollo de inflamación hepática (194). En el caso de los ratones IL-6 KO, este fenotipo está asociado con una mayor acumulación lipídica en este tejido causada por defectos en el metabolismo mitocondrial (195).

Por último, de especial interés es el papel de esta citoquina en la regulación metabólica a nivel muscular. Durante el ejercicio intenso, el músculo incrementa marcadamente la producción y liberación de IL-6, de forma proporcional a la duración e intensidad del ejercicio (196,197). El aumento de la producción de IL-6 en esta situación no está relacionado con daño tisular ni con el desarrollo de inflamación como demuestra el hecho de que no se observen cambios en los niveles de otras citoquinas pro-inflamatorias (198,199). El ejercicio físico no sólo incrementa la síntesis de IL-6 sino también la producción de IL-6R α por las células musculares, lo que demuestra un efecto sensibilizador del ejercicio a la acción local de esta citoquina (200). De hecho, estudios recientes demuestran que IL-6 podría promover la captación y utilización muscular de sustratos energéticos durante el ejercicio. Inicialmente se demostró que la administración de IL-6 en humanos durante ejercicio incrementa la utilización de glucosa en el organismo, efecto que no se observa en reposo (201). Además, la administración aguda de IL-6 en ratas incrementa la oxidación muscular de ácidos grasos (202). Por otro lado, experimentos in vitro, en miocitos, demuestran que esta citoquina incrementa la captación de glucosa basal inducida por insulina, mediante la

estimulación de la traslocación de GLUT-4, efecto que parece estar relacionado con una estimulación de AMPK (203,204). Por todo ello se ha concluido que IL-6 producida por el músculo en respuesta al estímulo agudo del ejercicio podría ejercer un efecto beneficioso. En apoyo de esta hipótesis los animales deficientes en IL-6 muestran una menor resistencia al ejercicio físico (205).

3. CIRCUITOS CENTRALES EN EL CONTROL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Al igual que ocurre en gran parte de los mecanismos que controlan procesos fisiológicos, el SNC juega un papel clave en la regulación de la homeostasis energética. Como se mencionó en la introducción, circuitos nerviosos centrales procesan e integran de manera continua señales neurales, metabólicas y endocrinas, y coordinan una respuesta que modula tanto patrones conductuales (ingesta y actividad locomotora) como el metabolismo periférico dependiendo de las necesidades energéticas del organismo a corto y largo plazo. La transmisión y procesamiento de esta información procedente de la periferia a nivel encefálico es un proceso complejo, dependiente de interacciones entre redes neuronales distribuidas a lo largo de distintas estructuras anatómicas. La especificidad funcional de la comunicación nerviosa depende de varios factores: 1) la adecuada conectividad anatómica, establecida mediante sinapsis, entre neuronas dentro de una vía neural dada, 2) el tipo de neurotransmisores utilizados para la transmisión de la información de una célula a la siguiente y 3) la presencia de receptores específicos en las células diana, no sólo para estos mensajeros químicos, sino también para señales metabólicas y hormonales periféricas (206).

A lo largo del último siglo nuestro conocimiento acerca de estos circuitos centrales ha crecido exponencialmente con la identificación de sistemas peptidérgicos clave en la regulación de la homeostasis energética, su modulación en respuesta a señales aferentes periféricas y centrales, sus interconexiones y su distribución a lo largo de distintas estructuras encefálicas (207). Así, el hipotálamo junto con el tronco del encéfalo, juega un papel crucial en el control homeostático de la ingesta, almacenamiento y la utilización de sustratos energéticos por parte de las células del organismo en función de la información metabólica interoceptiva. Sin embargo, aunque no son objeto de estudio en este trabajo, además de estos factores homeostáticos, la ingesta también está influenciada por mecanismos no homeostáticos implicados en la percepción de motivación y recompensa ante el consumo de alimentos de alta

palatabilidad. Estos sistemas son controlados por complejas redes neurales, localizadas en áreas cortico-límbicas y centros corticales superiores, implicadas en la integración, procesamiento y almacenamiento de información sensorial exteroceptiva (visual, olfativa, táctil y gustativa) acerca de las características de los alimentos. Aunque sus fines son completamente diferentes, -el mantenimiento del equilibrio energético del organismo para los primeros y la generación de señales de refuerzo y recompensa para los segundos-, uno y otro tipo de mecanismos no actúan de forma independiente, existiendo un elevado grado de solapamiento entre los circuitos de los que ambos dependen (208,209).

3.1. Circuitos hipotalámicos

El hipotálamo es una pequeña estructura cerebral localizada en la región ventral del diencefalo, delimitada rostralmente por el quiasma óptico, lateralmente por los tractos ópticos y los pedúnculos cerebrales, y caudalmente por los cuerpos mamilares. En mamíferos esta estructura diencefálica está compuesta de más de 40 núcleos y áreas, entre los cuales el núcleo paraventricular, arcuato, ventromedial y dorsomedial además del área hipotalámica lateral y el área perifornical han sido relacionados con la regulación del metabolismo energético (210).

3.1.1 El núcleo Arcuato

El Núcleo Arcuato hipotalámico (ARC) juega un papel crucial en la integración hipotalámica del balance energético gracias a su localización anatómica, a ambos lados del tercer ventrículo y sobre la eminencia media que carece de barrera hematoencefálica (211). Este hecho junto con la expresión de múltiples receptores hormonales en la membrana sus neuronas, determina su actividad y le confiere una mayor sensibilidad a una gran variedad de señales periféricas.

En esta región destacan dos poblaciones neuronales interconectadas entre sí, que opuestas funcionalmente, ejercen potentes efectos moduladores sobre la ingesta, el gasto energético y el metabolismo. Así, un circuito neuronal estimula la ingesta a través de la producción de los péptidos orexigénicos neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP), mientras que un segundo grupo de neuronas co-exprende la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por anfetamina y cocaína (CART), ambos péptidos inhibidores de la ingesta o anorexigénicos. La actividad de estas neuronas es regulada por leptina, insulina, ghrelina, PYY y otras señales

periféricas. En situaciones de balance energético negativo, la disminución de la concentración plasmática de leptina e insulina conlleva la estimulación de las neuronas productoras de NPY/AgRP y la inhibición de las neuronas productoras de POMC/CART, lo que induce la consiguiente estimulación de la ingesta e inhibición del gasto energético (212). Los efectos de ambas poblaciones neuronales sobre el metabolismo energético están mediados en parte a través de acciones contrarias sobre el mismo mecanismo de señalización, conocido como la vía central de las melanocortinas (213) (Fig.4).

3.1.1.1. Neuropéptido Y (NPY)

El neuropéptido Y se encuentra ampliamente distribuido a lo largo de todo el sistema nervioso, siendo sus niveles particularmente altos en el hipotálamo donde se sintetiza mayoritariamente en neuronas del núcleo ARC (214). Estas poblaciones neuronales responden a cambios en el balance energético aumentando la producción y secreción de NPY en situaciones en las que aumentan las demandas metabólicas, como el ayuno, la lactancia, la diabetes mellitus insulina-dependiente y el ejercicio (215). La producción de NPY en otros núcleos como el NPV y NDM, es reducida y procede, en su mayoría, de la aportación de los terminales nerviosos de neuronas productoras de NPY en el tronco del encéfalo y el núcleo ARC. La administración crónica de NPY, i.c.v o directamente a nivel del NPV, estimula marcadamente la ingesta provocando en último término hiperfagia y obesidad. Por ello, este neuropéptido es considerado uno de los más potentes agentes orexigénicos. Sin embargo, además de su papel en la modulación de la ingesta, la administración central de este neuropéptido en rata, reduce la termogénesis en el tejido adiposo marrón, mediante la disminución de la actividad nerviosa simpática y una inhibición del eje tiroideo. Además, NPY ejerce efectos anabólicos al estimular no sólo la secreción de insulina y glucocorticoides sino también la actividad de enzimas lipogénicas del hígado y del tejido adiposo (216,217). Curiosamente, aunque NPY es una señal orexigénica clave en el circuito que controla el balance energético, los ratones KO de NPY presentan una tasa de ingesta, porcentaje de tejido graso y peso corporal normal (218) y la deficiencia de NPY, sólo es capaz de producir un efecto claro sobre ingesta y gasto energético cuando se combina con la ausencia de leptina funcional en ratones ob/ob (219). Esto sugiere la existencia de mecanismos de compensación que amortiguan la ausencia de una señal orexigénica tan importante como NPY evitando alteraciones en la ingesta, que sólo en una situación límite para el sistema como es el caso de un marcado fenotipo de obesidad son

parcialmente superados. De hecho, la eliminación selectiva de las neuronas productoras de AgRP/NPY en el arcuato resulta en un fenotipo de hipofagia y delgadez únicamente cuando esta se realiza en la etapa adulta pero no en la neonatal, indicando que estos mecanismos de compensación pueden ponerse en marcha únicamente en etapas tempranas del desarrollo (220)

Como otros miembros de la familia del polipéptido pancreático NPY ejerce sus funciones biológicas a través de su unión a un grupo de receptores acoplados a proteínas G, de los que se han identificado seis subtipos Y1-Y6 (221). De los cuales Y1-Y5 se han identificado en cerebro de rata mientras Y6 es una variante específica de ratón. Aunque Y1-Y5 se hayan postulado como los principales mediadores de las acciones orexigénicas de NPY, el estudio de animales deficientes en los distintos subtipos del receptor y el uso in vivo de antagonistas y agonistas subtipo específicos han demostrado que las restantes isoformas están implicadas en otros aspectos de las acciones anabólicas de NPY (222).

3.1.1.2. Sistema de las melanocortinas

El sistema de las melanocortinas constituido por los péptidos derivados de POMC, (223) sus receptores y los antagonistas endógenos, AgRP y aguti, además de sus funciones en la modulación del sistema inmune y endocrino juega un papel clave en la regulación de la homeostasis energética.

El gen de POMC se expresa en una amplia variedad de tejidos incluyendo el hipotálamo concretamente en neuronas del núcleo ARC, el NTS, además de en la adenohipófisis, la piel, el estómago, la placenta y el páncreas. En el hipotálamo, la expresión de POMC es regulada por el estado nutricional, presentando bajos niveles tras el ayuno, que se restablecen tras la ingesta de alimentos (215). En humanos y en roedores, mutaciones en el gen de POMC o alteraciones en su procesamiento dan lugar al desarrollo de obesidad temprana, hiperfagia y diferentes alteraciones endocrinas (224).

El procesamiento post-traducciona l de POMC varía originando péptidos diferentes dependiendo de las enzimas procesadoras presentes en su lugar de síntesis fundamentalmente pre-prohormona convertasa 1 y 2 (PC-1 y PC-2). Entre los péptidos sintetizados a partir de POMC se encuentran las hormonas estimulantes de melanocitos α , β , γ -MSH, la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la β -endorfina (225).

Las acciones de estos péptidos son mediadas por una familia de receptores acoplados a proteínas G, de la cual han sido identificados cinco miembros (MC1-5R). Entre ellos

únicamente MC3R y MC4R, que se encuentran ampliamente distribuidos en el hipotálamo, concretamente en los núcleos ARC, NVM, NPV y AHL además de en el NTS, se han relacionado con la regulación de la ingesta y el balance energético (226). Aunque el papel de MC4R en la regulación de la ingesta está claramente definido, MC3R parece estar involucrado en la regulación del gasto energético y la utilización de sustratos energéticos por los tejidos. Así, la ausencia de MC4R da lugar a hiperfagia y obesidad en roedores (227), y mutaciones en el gen de MC4R son la causa del 1-6% de los casos de obesidad severa en humanos (228). Sin embargo los ratones deficientes en MC3R a pesar de su mayor grado de adiposidad cuando son mantenidos en dieta estándar y del desarrollo de obesidad moderada cuando son alimentados con dieta rica en grasas, o son hipofágicos o no muestran variaciones en el patrón de ingesta respectivamente. En este caso, este fenotipo parece ser debido a un menor gasto energético y actividad locomotora, junto con una preferente utilización de hidratos de carbono en lugar de grasas como fuente de energía (229). Además, se ha descrito que en roedores la administración central y periférica de agonistas selectivos para MC3R o bien no afecta o curiosamente estimula la ingesta (230,231). Por último, remarcando la posible implicación de ambos receptores en aspectos independientes de la regulación del balance energético, la doble mutación de MC3R y MC4R en el ratón causa un mayor incremento del peso corporal que la delección de cada uno de ellos por separado. A este respecto, la abundante presencia de MC3R en la membrana de las células productoras de POMC y AgRP en el arcuato, ha llevado a postular su posible implicación en un mecanismo de retroalimentación que permitiría controlar el tono melanocortinérgico y la actividad de POMC (232).

El principal ligando endógeno de los receptores MC3/MC4 es α -MSH, que es sintetizado mayoritariamente en el hipotálamo junto a CART otro péptido inhibidor de la ingesta, por un grupo de neuronas localizado en la parte lateral del núcleo ARC. La administración central de α -MSH y de sus análogos farmacológicos, como el melanotán II en roedores, suprime la ingesta de alimentos además de causar un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo blanco y de la termogénesis en el tejido adiposo marrón, junto con una activación del eje tiroideo (233). Las poblaciones neuronales productoras de POMC y por tanto de α -MSH a su vez inervan otros núcleos y áreas del hipotálamo como el NPV, NDM y AHL, y en menor medida el NVM (234). En concreto, neuronas productoras de α -MSH proyectan sus axones hacia neuronas en el AHL productoras de otros dos péptidos orexigénicos: orexina y MCH (hormona concentradora de la

melanina) y hacia neuronas preganglionares simpáticas de la médula espinal, que actúan modulando el gasto energético mediante cambios en el tono simpático. Otras posibles dianas de la acción de α -MSH sobre la regulación del SNS son el núcleo NPV y NVM, puesto que la inyección de MTII directamente en ambos núcleos estimula la captación de glucosa en el tejido adiposo marrón (235), y en concreto eleva la temperatura de este tejido cuando es administrado en el núcleo NPV. Este núcleo es la fuente de una alta densidad de eferentes simpáticas que inervan el tejido adiposo marrón. Por otro lado, la activación por MTII de los receptores MC4R en el NPV provoca además una marcada inhibición de la ingesta probablemente a través de su acción sobre una pequeña subpoblación neuronal que co-expresa el péptido anorexigénico CRH (hormona liberadora de la corticotropina).

El sistema de melanocortinas cuenta además con dos antagonistas endógenos: la proteína agutí y el neuropéptido AgRP. La producción ectópica de agutí, antagonista endógeno de los receptores de MC1/MC4, cuya expresión está restringida normalmente a la piel, da lugar al fenotipo obeso, hiperfágico e hipometabólico de los ratones *Ay/-* (236). Posteriormente se demostró que AgRP, que fue identificado en virtud de su homología con la proteína agutí, se expresa fundamentalmente en el cerebro, concretamente en la región medial del ARC, donde es sintetizado por aproximadamente el 95% de las neuronas que expresan NPY (237). AgRP es un potente antagonista selectivo de los receptores MC3/MC4, siendo su administración i.c.v. capaz de bloquear la acción anorética de α -MSH. De manera similar a lo observado en los ratones *Ay/-*, los transgénicos que sobre-expresan AgRP desarrollan obesidad, aunque carecen de la coloración amarilla característica de los primeros puesto que AgRP no ejerce sus efectos antagónicos a través de los receptores MC1 (238). Sin embargo los ratones deficientes en esta proteína, así como el doble knockout de AgRP/NPY no muestran alteraciones ni en ingesta ni en peso corporal (239). Recientemente, en la búsqueda de posibles mecanismos alternativos que justificasen la falta de efecto sobre la ingesta de la delección de NPY y/o AgRP en el ratón, múltiples estudios han centrado su atención sobre el papel de otros neurotransmisores, como el ácido γ -aminobutírico (GABA), que junto con NPY es producido por las mismas neuronas que AgRP (240). La implicación de GABA como un mediador esencial de la acción de las neuronas AgRP/NPY/GABA en la regulación de la ingesta, se fundamenta en la observación de que en animales que carecen de expresión constitutiva de NPY y AgRP, la eliminación selectiva de las neuronas productoras de estos tres neurotransmisores en el núcleo ARC genera un

fenotipo de hipofagia marcada (241). La inactivación de la señalización de GABA por estas neuronas mediante la delección selectiva del transportador vesicular de GABA (Vgat) genera un fenotipo delgado en el ratón, resistente a la obesidad inducida por la dieta y a la acción orexigénica de ghrelina (242). De hecho, la administración de agonistas selectivos del receptor GABA_A a nivel del núcleo parabraquial del tronco encefálico, implicado en la integración de la información sensorial visceral y gustativa, es suficiente para mantener una tasa de ingesta normal a pesar de la destrucción selectiva de las neuronas AgRP/NPY/GABA (240).

Todos estos datos en conjunto indican que las neuronas productoras de AgRP/NPY/GABA que proyectan en su mayoría a las mismas poblaciones neuronales que las neuronas POMC, podrían bloquear la acción de α -MSH a través de tres vías: 1) secretando AgRP que antagonizaría la unión de α -MSH a los receptores MC4R; 2) secretando NPY que actuaría a través de receptores Y1 e Y5 en células que también disponen de receptores MC4R y 3) a través de la acción inhibitoria de GABA de forma independiente de los receptores MC4R (Fig.4).

3.1.2. El área hipotalámica lateral (AHL)

El área o zona hipotalámica lateral es una de las áreas más profusamente interconectadas del hipotálamo constituida por numerosos grupos neuronales que reciben una amplia variedad de información interoceptiva y exteroceptiva en respuesta a la cual modulan funciones cognitivas, motoras, endocrinas y autónomas. Las principales aferencias al AHL provienen de varias regiones corticolímbicas y distintas estructuras del tronco encefálico como el NTS. Las aferencias procedentes de la región medial del hipotálamo, a pesar de ser escasas, poseen una gran relevancia funcional como es el caso de las proyecciones de las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP del núcleo ARC. La secreción de NPY en el área perifornical de esta región hipotalámica es de considerable magnitud, ejerciéndose en este núcleo su máxima acción orexigénica.

En esta área hipotalámica varias poblaciones neuronales independientes producen los péptido anorexigénicos CART y neurotensina y, los péptidos orexigénicos hormona concentradora de melanina (MCH) y orexinas (orexina-1 y -2) (243)

3.1.2.1. Hormona concentradora de la melanina (MCH)

El neuropéptido MCH de manera similar a lo que ocurre con otros neuropéptidos orexigénicos aumenta su expresión durante el ayuno, restableciendo sus niveles tras la administración de leptina. La administración i.c.v crónica de MCH en roedores induce

hiperfagia y un aumento del contenido de masa grasa y del peso corporal estimulando la actividad lipogénica del hígado y del tejido adiposo. Además, su sobre-expresión induce el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina. Por el contrario, la deficiencia de MCH en el ratón provoca resistencia a la obesidad inducida por la dieta, debido a un aumento del gasto energético y de la actividad locomotora (244) (Fig.4).

3.1.2.2. Orexinas

Las orexinas A y B (OX A-B), moléculas derivadas del precursor común prepro-orexina (Prepro-OX), son producidas principalmente en poblaciones neuronales del AHL que co-expresan el opioide dinorfina también implicado en la regulación del balance energético. Estas neuronas disponen de profusas proyecciones a varios núcleos hipotalámicos como el ARC y NPV y regiones del tronco encefálico implicadas en la modulación de distintos aspectos de comportamiento alimenticio y la actividad simpática, como el complejo vagal dorsal y el núcleo del raphe (245). La administración aguda de ambas orexinas a nivel central estimula la ingesta en roedores, y la expresión de prepro-OX, se incrementa durante situaciones de ayuno para retornar a niveles normales tras la administración de leptina (246). Sin embargo, ratones deficientes en estos neuropéptidos sólo exhiben una ligera reducción de la ingesta, junto con narcolepsia y una disminución de la actividad locomotora que en conjunto culminan en el desarrollo de obesidad (247). Además, la sobreexpresión de orexinas en el ratón confiere resistencia a la obesidad inducida por la dieta estimulando el gasto energético e inhibiendo la ingesta. Apoyando estos datos la narcolepsia en humanos está asociada a una reducción de los niveles de orexinas en LCR y a un mayor índice de masa corporal. Aunque existen dos subtipos de receptores de orexinas (OX1R y OX2R), las acciones de estos péptidos sobre el balance energético dependen principalmente de su unión a OX2R. Así, ratones deficientes en este receptor son hiperfágicos y manifiestan un fenotipo obeso más marcado que sus controles cuando son alimentados con dieta rica en grasas. Estas observaciones sugieren un efecto catabólico global de las orexinas sobre el balance energético, estimulando tanto la actividad locomotora como el gasto energético (248).

3.1.3. El núcleo paraventricular (NPV)

El NPV es un núcleo integrador de señales procedentes de diversas áreas hipotalámicas como el AHL y los núcleos ARC y NDM, además de recibir aferencias procedentes del tronco del encéfalo y otras regiones de la corteza y el sistema límbico. Este núcleo

produce diversos péptidos que participan en la regulación de la ingesta, la termogénesis y la función endocrina como los péptidos anorexigénicos hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y hormona liberadora de la tirotropina (TRH). Las principales eferencias no endocrinas de este núcleo se dirigen a regiones pre-ganglionares autónomas del tronco encefálico y de la medula espinal y modulan la actividad del SNS (249).

El importante papel del NPV en la regulación de la homeostasis energética quedó de manifiesto tras comprobarse que la lesión de este núcleo en ratas provocaba hiperfagia y, que la deficiencia en heterocigosis, tanto en humanos como en roedores del factor transcripción Sim-1, esencial para el desarrollo neuronal adecuado del NPV, da lugar a un fenotipo de obeso (210). Así, la inyección a nivel de este núcleo, de la práctica totalidad de las señales orexigénicas y anorexigénicas conocidas modifica la ingesta (250). En este contexto, recientemente se ha descrito que la deficiencia de IL-6 en el ratón, da lugar a la inhibición de la síntesis de los principales neuropéptidos expresados en el NPV. Por ejemplo, los niveles de expresión de CRH y oxitocina se encuentran significativamente disminuidos en los ratones IL-6 KO respecto a sus controles de genotipo salvaje, tras el desarrollo de obesidad en la madurez (251). Igualmente la sobre-expresión de esta citoquina a nivel central modula la expresión de CRH de forma dependiente de la edad, observándose un incremento de los niveles de ARNm de este péptido a los 12 meses de edad (252). Además, el receptor α de IL-6 se expresa abundantemente en este núcleo, así como también en el núcleo supraóptico, y coexpresa con CRH, TRH y oxitocina. Estos resultados apuntan al papel de IL-6 en la regulación de la homeostasis energética a nivel del NPV (251) (Fig.4).

3.1.3.1. La hormona liberadora de la corticotropina (CRH)

Descubierta y secuenciada en 1981 (253), la hormona liberadora de la corticotropina, es el principal neuropéptido estimulador de la secreción adenohipofisaria de ACTH que a su vez estimula la secreción de corticosterona por la glándula adrenal. Además de sus acciones endocrinas, este neuropéptido es un mediador esencial de la respuesta al estrés, disminuyendo la ingesta, aumentando la actividad locomotora y el gasto energético. Así, la administración i.c.v. de este neuropéptido en ratas, causa anorexia y provoca un aumento en la actividad del sistema nervioso simpático en el tejido adiposo marrón estimulando la termogénesis, y reduciendo de esta manera el peso corporal (254). Diversas evidencias experimentales sugieren un papel relevante de CRH como

mediador de la acción anorética de leptina. La administración i.c.v. de leptina incrementa la expresión de CRH en el NPV en ratas sometidas a ayuno y la inhibición de la ingesta mediada por leptina es atenuada mediante el bloqueo de la señalización de este neuropéptido con antagonistas no selectivos de su receptor (255). Las acciones biológicas de este neuropéptido son mediadas por la unión a su receptor del que se han identificado dos subtipos CRHR1 y CRHR2, siendo CRHR1 el que presenta un patrón de distribución más amplio a lo largo del hipotálamo localizándose mayoritariamente en el NPV, en el ARC y NDM. El hecho de que sólo la microinyección de CRH en el NPV inhiba la ingesta inducida por NPY sugiere que este neuropéptido podría actuar como un modulador las señales orexigénicas en este núcleo.

3.1.3.2. La hormona liberadora de la tirotropina

La hormona liberadora de la tirotropina (TRH) juega un papel relevante en la regulación de la homeostasis energética no sólo a través de sus efectos sobre la función tiroidea, dirigida por las neuronas hipofisiotropas en el NPV, sino también a través de sus efectos centrales sobre ingesta, termogénesis, actividad locomotora y actividad simpática. En el hipotálamo, TRH se expresa en diversos núcleos, aunque las neuronas implicadas en el control de la tirotropina (TSH) se localizan casi exclusivamente en el NPV. Una población de neuronas parvocelulares en la región medial y periventricular de este núcleo expresan TRH y proyectan hacia la zona externa de la eminencia media donde liberan este neuropéptido, que alcanza la adenohipófisis induciendo la síntesis y liberación de TSH, que estimula la producción y secreción de hormonas tiroideas. Estas últimas juegan un papel esencial en la regulación de la termogénesis, la actividad metabólica de los tejidos periféricos y la regulación de la conducta alimentaria (256).

Sin embargo, además de las acciones anorexigénicas indirectas de TRH estimulando la producción de T3, la administración central de este neuropéptido y sus análogos en distintos modelos animales inhibe la ingesta y la actividad física asociada a la búsqueda de alimento, sin alterar los niveles circulantes de TSH (256). Aunque el mecanismo concreto no está del todo esclarecido se ha sugerido que las neuronas no hipofisiotropas pueden modular la ingesta a través de sus proyecciones al núcleo NVM donde se ha detectado la presencia del receptor tipo 1 de este neuropéptido (TRH-1R). Otra posibilidad sería que neuronas productoras de TRH localizadas en el NPV proyectasen al AHL para inhibir la expresión de péptidos orexigénicos como MCH y orexinas (257). Aunque la actividad de estas neuronas productoras de TRH localizadas en la región

anterior del NPV (aNPV) no está regulada por los niveles circulantes de hormonas tiroideas, al igual que las neuronas hipofisiotropas están profusamente innervadas por axones de neuronas productoras de AgRP/NPY y α -MSH/CART, hecho que sugiere su posible implicación en la regulación fisiológica de la ingesta.

Recientemente estudios neuroanatómicos han delimitado las proyecciones de las neuronas no hipofisiotropas en la región anterior del NPV. Dado que la mayor parte de estas proyecciones incluyen los núcleos ARC y NDM, sería lógico hipotetizar que las acciones anoréticas de este neuropéptido podrían estar mediadas por poblaciones neuronales localizadas en estos núcleos (258). Además, las conexiones de neuronas productoras de TRH en el aNPV con otras áreas extrahipotalámicas del sistema límbico y del tálamo sugieren su participación en la integración de la regulación del apetito y la saciedad con otros componentes de la homeostasis energética como por ejemplo la actividad locomotora y la función gastrointestinal. La existencia de un pequeño grupo de neuronas productoras de este neuropéptido en la región perifornical del AHL que proyectan al núcleo ventromedial sugieren su participación en el control de la ingesta a nivel de este núcleo (258).

Por último, la administración central de TRH aumenta la temperatura rectal y del tejido adiposo marrón, sin afectar los niveles circulantes de T3, efectos que son bloqueados mediante pre-tratamiento con anticuerpos contra el receptor TRHR-1. Las acciones termogénicas de TRH a nivel central podrían ser mediadas por la liberación de este neurotransmisor en otros núcleos hipotalámicos como el NDM y el área preóptica implicados en la regulación autónoma a través de sus proyecciones al tronco del encéfalo y la médula espinal (259). Por otro lado poblaciones neuronales productoras de TRH a nivel del tronco encefálico podrían participar en la regulación central de la termogénesis. Así, recientemente se ha descrito que este neuropéptido anorexigénico ejerce un efecto sinérgico junto a leptina en el tronco encefálico, activando la respuesta termogénica del tejido adiposo marrón. Únicamente el efecto combinado de ambas hormonas en esta región es capaz de producir un aumento de temperatura en este tejido, mientras que la acción de cada una de ellas por separado, no es capaz de generar este efecto (260).

3.1.4. Otros núcleos hipotalámicos: ventromedial y dorsomedial (NDM y NVM).

Otras regiones hipotalámicas a tener en cuenta en la modulación central de la homeostasis energética son el núcleo dorsomedial (NDM) y el núcleo ventromedial (NVM).

El núcleo dorsomedial (NDM) se localiza por encima del ARC y recibe gran cantidad de aferencias de circuitos neuronales derivados del ARC, NPV, AHL y tallo cerebral por lo que ha sido considerado como un núcleo de integración, procesando información procedente no sólo de otras regiones hipotalámicas sino también procedente de la periferia como demuestra la elevada expresión de receptores de insulina y leptina en este núcleo. El NDM contiene además una pequeña población de neuronas productoras de NPY, que son activadas en situaciones de balance energético negativo como el ayuno, la lactancia y el ejercicio físico (261). Distintas evidencias sugieren la participación de este núcleo en la regulación central de la termogénesis a través de sus conexiones con estructuras del tronco del encéfalo como la región dorsal del núcleo rafe (262). Así, la exposición al frío y la administración de endotoxina incrementa la expresión del gen de respuesta inmediata fos en neuronas de este núcleo. La activación de neuronas del NDM mediante el bloqueo de la señalización gabaérgica a este nivel incrementa la estimulación simpática del tejido adiposo marrón y la termogénesis y, por el contrario, la inhibición de las mismas poblaciones neuronales bloquea la actividad termogénica de este tejido (262). En apoyo de estas evidencias recientemente se ha descrito que el bloqueo de la expresión de NPY en este núcleo mediante la administración de ARNm de interferencia incrementa la respuesta termogénica al frío del TAM (aumentando la expresión basal de UCP-1), así como también la actividad locomotora y la sensibilidad a la insulina mejorando la homeostasis general de la glucosa (263)

El núcleo ventromedial (NVM) fue considerado en un principio como el “centro de la saciedad”, debido a que su pérdida causaba hiperfagia y obesidad en ratas (264). Por el contrario, la estimulación eléctrica de este núcleo suprime la ingesta, estimula el gasto energético e induce lipólisis mediante la estimulación de la actividad del SNS (265). Este núcleo parece estar implicado además en la regulación de la actividad física puesto que el aumento de la excitación neuronal a este nivel no sólo disminuye la ingesta sino que aumenta la actividad locomotora en ratas (266). EL NVM además de estar interconectado con otros núcleos hipotalámicos como el ARC y NDM, emite proyecciones a otras regiones cerebrales implicadas en la regulación de la homeostasis energética como el NTS. La distribución anatómica de este núcleo, así como si su integridad funcional se ven alteradas por la deficiencia en el ratón del receptor nuclear huérfano SF-1 (factor esteroideogénico-1) dando lugar al desarrollo de hiperfagia y obesidad, mediada entre otras causas por la menor expresión del factor neurotrófico

BDNF (267). Así, la delección selectiva en este núcleo de BDNF resulta en un fenotipo obeso similar (268).

El NVM contiene una gran cantidad de neuronas sensibles a glucosa que se activan en respuesta a la hipoglucemia, además de responder a través de sus receptores a cambios en los niveles circulantes de otras señales periféricas como leptina, ghrelina, hormonas tiroideas y estrógenos (269). Además, esta área hipotalámica presenta receptores para distintos péptidos y neurotransmisores con funciones anorexigénicas como serotonina, GABA, e histamina, o estimuladores de la ingesta como la dopamina (270) (Fig.4).

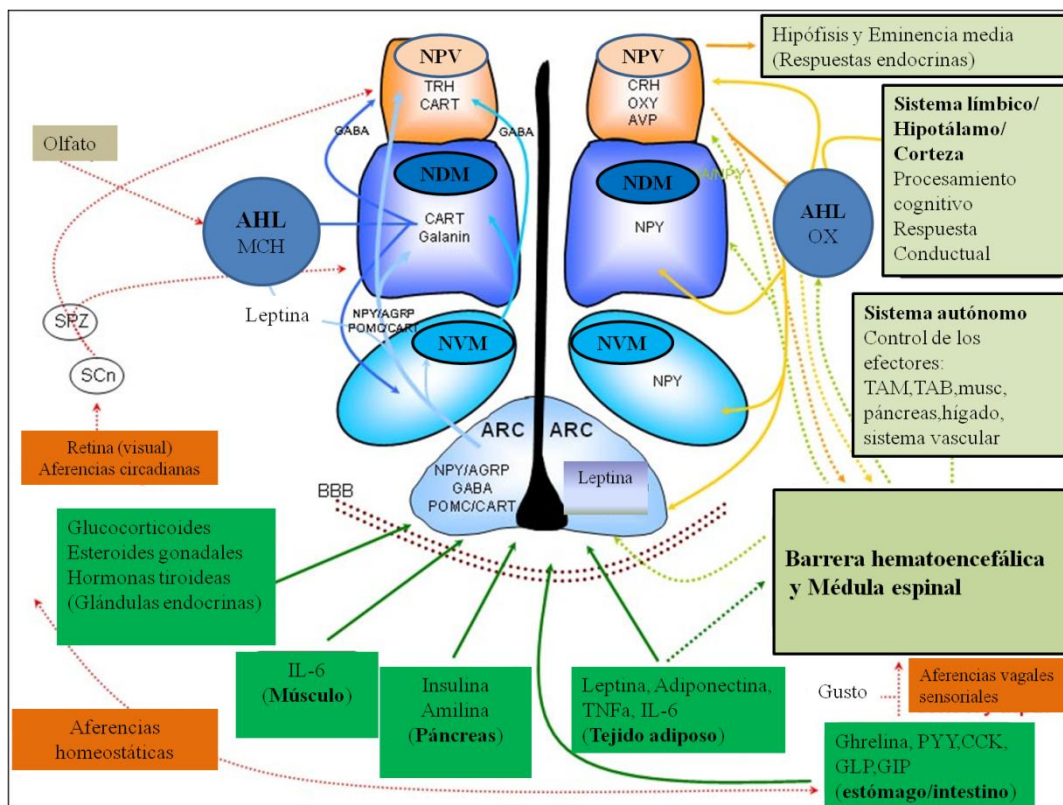


Figura 4. Circuitos neuroendocrinos que participan en la regulación de la homeostasis energética. Modificada de Castañeda T.R., 2005, American Society for Nutritional Sciences.

3.2. Señalización metabólica y circuitos hipotalámicos

Además de su capacidad de respuesta frente a los niveles de hormonas circulantes, el hipotálamo también responde ante la variación en las concentraciones de sustratos energéticos, tales como la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos, de manera que estas señales interactúan con los circuitos hipotalámicos implicados en la modulación del estado energético, induciendo cambios en la ingesta y el gasto energético (271).

Por ejemplo, a nivel hipotalámico se ha descrito la existencia de dos tipos de poblaciones neuronales sensibles a glucosa: unas estimuladas por concentraciones elevadas de glucosa, localizadas fundamentalmente en el AHL y otras estimuladas por

la presencia de bajos niveles de glucosa localizadas abundantemente en el NVM. Así, en el núcleo ARC las neuronas productoras de POMC pertenecerían al primer grupo, mientras que las neuronas productoras de AgRP se englobarían en el segundo.

A lo largo de los últimos años múltiples evidencias experimentales han demostrado que el metabolismo lipídico a nivel hipotalámico constituye un mecanismo crucial en la regulación de la homeostasis energética. Inicialmente, se demostró que la administración central de ácidos grasos libres de cadena larga (LCFA-CoA), como el ácido oleico, inhibe la ingesta y disminuye el peso corporal (272), y diversos estudios genéticos y farmacológicos han demostrado que la alteración de los niveles de expresión y la actividad de muchas de las enzimas implicadas en la síntesis y oxidación de ácidos grasos a nivel hipotalámico modulan la ingesta. Así, la expresión de enzimas como AMPK, acetil-CoA carboxilasa (ACC), carnitin palmitoil transferasa-1(CPT-1), ácido graso sintasa (FAS) y malonil-CoA decarboxilasa es abundante en núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta y el gasto energético como el ARC, NDM, NPV y NVM (273). La inhibición farmacológica de la expresión y/o actividad de la enzima FAS, genera un aumento de los niveles de su sustrato malonil-CoA a nivel hipotalámico. Este aumento de la concentración hipotalámica de malonil-CoA actúa como una señal anorética que refleja la abundancia de nutrientes y desemboca en una disminución de la expresión de neuropéptidos orexigénicos como AgRP y NPY y un aumento de la expresión de neuropéptidos anorexigénicos como POMC y CART (274,275). Además, la producción hipotalámica de malonil-CoA es modulada en función del estado energético del individuo de tal manera que el ayuno provoca una disminución de la misma, redirigiendo la utilización de sustratos hacia la oxidación de ácidos grasos (276). La relevancia de esta vía metabólica en la regulación fisiológica de la ingesta queda de manifiesto por el hecho de que hormonas de acción anorexigénica como leptina e insulina y antagonistas de los receptores de melanocortinas, como el melanotán II, estimulan la producción hipotalámica de malonil-CoA y la actividad de FAS. Por el contrario, señales orexigénicas como glucocorticoides, adiponectina, ghrelina y AgRP ejercen el efecto contrario, estimulando la actividad de AMPK que resulta en una inhibición de la actividad de ACC, disminuyendo en consecuencia la concentración de su producto malonil-CoA y la actividad de FAS.

4. SEÑALES EFERENTES EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

El correcto control del balance energético implica la integración por el SNC de las señales aferentes procedentes de los distintos tejidos periféricos y la generación por éste de señales eferentes a través de tres vías efectoras: el sistema motor somático, regulando el comportamiento que incluye la actividad física y la conducta alimentaria; el sistema neuroendocrino, a través de la secreción de hormonas que regulan el metabolismo de los lípidos y carbohidratos en los tejidos periféricos, como la hormona de crecimiento, hormonas tiroideas y los glucocorticoides, entre otros; y el sistema nervioso autónomo, que regula el gasto energético, además de la utilización de sustratos por los tejidos que inerva (208).

El sistema nervioso autónomo está constituido por el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema nervioso parasimpático (SNP), ambos con bases anatómicas y funcionales diferentes. En resumen, las fibras pre-ganglionares simpáticas tienen su origen en segmentos torácicos y lumbares de la medula espinal desde donde se dirigen hacia la cadena simpática localizada en las proximidades de la médula. Las fibras simpáticas post-ganglionares de mayor longitud, que bien tienen su origen en alguno de los ganglios de la cadena simpática o en los ganglios prevertebrales, inervan los principales tejidos y órganos vitales. Por el contrario, las fibras pre-ganglionares parasimpáticas tienen su origen en el mesencéfalo, el tronco del encéfalo y la porción sacra de la médula espinal y, a excepción de los nervios parasimpáticos craneales, recorren sin interrupción todo el trayecto hacia el órgano que inervan en cuya pared se localizan las neuronas post-ganglionares. La mayoría de los órganos están inervados por fibras nerviosas de ambos tipos, con excepción de los vasos sanguíneos, las glándulas sudoríparas y el tejido adiposo que reciben fundamentalmente inervación simpática, siendo la presencia de terminales nerviosos parasimpáticos en este último tejido objeto de debate recientemente (277). Aunque en general la activación de las dos ramas del SNA provoca efectos fisiológicos opuestos, habitualmente actúan de manera recíproca de tal manera que un aumento en la actividad de una coincide con una disminución de la actividad de la otra (278).

Los principales neurotransmisores en los nervios autónomos son la acetilcolina y la noradrenalina. La acetilcolina es el neurotransmisor más frecuente en las sinapsis preganglionares, tanto simpáticas como parasimpáticas. La noradrenalina sin embargo

es el principal neurotransmisor postsináptico del SNS, mientras que los terminales nerviosos parasimpáticos liberan mayoritariamente acetilcolina. La acetilcolina activa dos tipos diferentes de receptores colinérgicos, muscarínicos y nicotínicos, mientras que la noradrenalina y otras catecolaminas (adrenalina y dopamina) ejercen su acción a través de la unión a receptores específicos en la superficie de sus células diana. Los efectos de noradrenalina y adrenalina son mediados por una serie de receptores, denominados genéricamente receptores adrenérgicos, que incluyen tres subtipos de receptores β (β_1 , β_2 , β_3) y dos subtipos de receptores α (α_1 y α_2 , cada uno de ellos con tres isoformas) codificados por genes independientes y miembros todos ellos de la familia de receptores acoplados a proteínas G (279). Los cinco tipos de receptores adrenérgicos difieren tanto en su afinidad por el ligando, como en las vías de señalización intracelular. Así, la activación de los receptores β (acoplados a proteínas Gs) da lugar a un aumento en la generación de AMPc, mientras que la activación de los receptores α_2 (acoplados a proteínas Gi) provoca el efecto opuesto, mediante la inhibición de la adenilatociclase. En el caso de los receptores α_1 , la activación de los mismos, da lugar a la generación de fosfoinositol y diacilglicerol que conlleva a un aumento del calcio intracelular y, en último término, a una disminución de los niveles de AMPc (280).

De hecho, como veremos en apartados posteriores, un factor importante en las acciones metabólicas de las catecolaminas es precisamente su capacidad de modular los niveles intracelulares de AMPc dependiendo del tipo de receptores activados. A este respecto, no sólo se han descrito diferencias en el patrón de expresión de los distintos subtipos de receptores α y β entre especies, sino también en su distribución tisular dentro de la misma especie (280,281).

La estimulación de la actividad del sistema nervioso parasimpático tiene lugar al inicio y durante el transcurso de la ingesta de alimentos. Ésta se inicia cuando los componentes sensoriales de los alimentos activan receptores de la cavidad orofaríngea, estimulando fibras vagales aferentes que proyectan al NTS que, a su vez, a través de sus proyecciones al núcleo dorsal del nervio vago, provoca la activación de fibras vagales eferentes. El nervio vago, que incluye en torno al 75% de las fibras nerviosas parasimpáticas, inerva la práctica totalidad de los tejidos y órganos implicados en la digestión, absorción y metabolización de los nutrientes y, por tanto, tiene la capacidad

de influenciar profundamente el procesamiento metabólico de los alimentos. Así, la activación de los eferentes vagales promueve el almacenamiento energético incrementando el depósito graso a través de sus efectos sobre la secreción de insulina y la sensibilidad del tejido adiposo a la misma (282).

Aunque inicialmente se consideraba que la estimulación del SNS ocurría de forma generalizada (“todo o nada”), evidencias experimentales indican que el flujo simpático es regulado de una manera tejido-específica en la mayoría de las situaciones fisiológicas (283,284). Únicamente en situaciones extremas, como por ejemplo en respuesta a una marcada disminución de la presión sanguínea o ante situaciones de estrés agudo, puede ocurrir una descarga simpática masiva. Por el contrario, en estados metabólicos de sobrealimentación, ayuno o hipoglucemia se produce una activación o inhibición selectiva de la inervación simpática en algunos órganos sin afectar el flujo simpático hacia otros. Los principales aspectos funcionales del SNS de interés en la regulación del metabolismo incluyen la regulación del sistema cardiovascular, de la función gastrointestinal y de la secreción de hormonas pancreáticas y, de manera más relevante, la estimulación de la lipólisis en el tejido adiposo y la estimulación del gasto energético a través de sus acciones sobre el músculo y el tejido adiposo marrón (285).

4.1. El gasto energético

Como ya se ha discutido previamente tanto el peso como la magnitud de los depósitos grasos del individuo fluctúan dependiendo de la diferencia entre el aporte de energía a través de la ingesta de alimentos y el gasto energético. La comprensión de la regulación del peso corporal hace necesario por tanto el conocimiento de los mecanismos que controlan ambos elementos de la ecuación del balance energético. El gasto energético puede clasificarse de forma genérica en dos categorías (286):

Obligatorio: consumo energético necesario para la supervivencia del individuo. Se compone de:

- *Metabolismo basal o tasa metabólica basal* (“resting metabolic rate”, RMR), consumo energético asociado a reacciones metabólicas esenciales como la respiración celular, el metabolismo o el mantenimiento de la temperatura corporal en condiciones de reposo y termoneutralidad. El metabolismo basal es el componente mayoritario del gasto energético total, constituyendo entre 50 a un 80% de su valor diario, y presenta una gran variabilidad entre individuos. Entre los principales factores responsables de

esta diversidad se encuentran el contenido de masa magra, la edad y el género, siendo esta mayor en hombres que en mujeres (287). Además de estos factores múltiples evidencias experimentales indican que otra fuente de variabilidad de la tasa metabólica basal entre individuos podría atribuirse a factores genéticos (288,289) asociándose bajos niveles de la misma con un incremento del peso corporal. De hecho, se ha demostrado la presencia de una baja tasa metabólica basal precediendo el aumento de peso corporal tanto en las primeras etapas del desarrollo infantil, como en la etapa adulta en humanos (290). Por otra parte, el metabolismo basal disminuye durante el ayuno, como un mecanismo adaptativo a la restricción calórica, disminuyendo de esta manera los requerimientos energéticos. Por último, los factores neuroendocrinos más importantes en su regulación son las hormonas tiroideas (286) y la actividad del SNS (291).

- *Termogénesis derivada la ingesta de alimentos*, gasto energético necesario para la ingestión, digestión y metabolización de los nutrientes regulado por el sistema parasimpático; constituye un 10% del gasto energético diario y tiene un componente adaptativo (35%) que depende de la dieta y está regulado por el sistema nervioso simpático. El efecto térmico de los alimentos ingeridos varía en función de su composición, siendo mayor con la ingesta de hidratos de carbono y proteínas que con la de grasas.

Facultativo: gasto energético asociado a actividades no vitales que es regulado en función de las necesidades energéticas del individuo e incluye:

- *Efecto térmico del ejercicio*, liberación de calor asociada al desarrollo de cualquier actividad física, que conlleva un incremento del metabolismo basal y la oxidación de grasas. Esto incluye un componente no voluntario (*spontaneous physical activity*; SPA) ligado al mantenimiento de la postura corporal y movimientos asociados a actos reflejos denominado *termogénesis causada por actividad no asociada al ejercicio* (nonexercise activity thermogenesis; NEAT) , que se ha postulado como posible factor indicativo de la resistencia de cada individuo al incremento de peso (292). Recientemente, múltiples estudios han demostrado que, tanto la actividad física voluntaria como el SPA se encuentran bajo estrecho control de distintos factores biológicos, tanto en humanos como en roedores (293). Entre los factores neuroendocrinos que se han relacionado con el control del SPA se encuentran: colecistoquinina, CRH, NPY, AgRP, orexinas, leptina y, ghrelina siendo la vía final y común para todas estas señales la modulación de la actividad dopaminérgica. Uno de los péptidos más estudiados en este contexto han sido las orexinas. Así, se ha demostrado que la inyección de orexina A en regiones

específicas del cerebro estimula marcadamente el SPA y el NEAT en ratas (294,295) mientras que su deficiencia en el ratón da lugar a un mayor peso corporal respecto a sus controles de genotipo salvaje, asociado a una reducción del SPA a pesar de la menor tasa de ingesta observada en estos animales (296).

- *Termogénesis adaptativa* o calor producido principalmente por el músculo esquelético y el tejido adiposo marrón (TAM) en respuesta a la exposición al frío (297) o a una dieta hipercalórica (298,299) que es regulada mayoritariamente por la estimulación del sistema nervioso simpático, y que constituye un componente importante en el gasto energético total que se analizará en detalle en el apartado 4.2.1. (Fig.5).

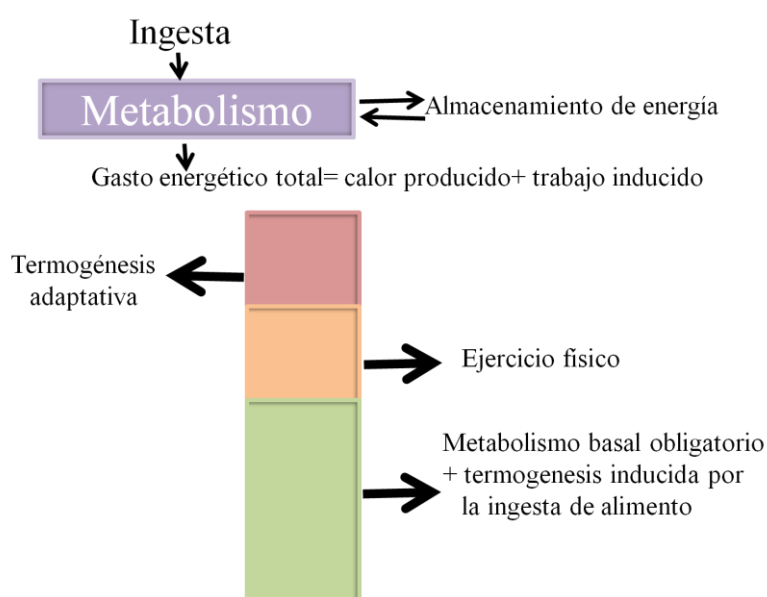


Figura 5. Componentes del gasto energético. Modificado de Lowell B.B, 2000, Nature 6;404(6778):652-60

4.2. Tejido adiposo y homeostasis energética

En mamíferos, el tejido adiposo consiste, funcionalmente, en dos tipos de tejido diferentes: el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM). Ambos tienen capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, sin embargo sus funciones, distribución y características morfológicas son diferentes. El tejido adiposo blanco (TAB) es un órgano heterogéneo formado por adipocitos maduros, así como también por fibroblastos, células endoteliales y macrófagos, los cuales constituyen cerca del 50% de su contenido celular total. El TAB se distribuye a lo largo del organismo y se localiza principalmente a nivel dérmico, subcutáneo, mesentérico, gonadal, y retroperitoneal (300). Los adipocitos blancos presentan una gran vacuola lipídica constituida principalmente por triglicéridos, que ocupa casi la totalidad del volumen

celular, y son capaces de variar considerablemente sus dimensiones para adaptarse a cambios en los niveles de reservas energéticas (301). Así, el tejido adiposo blanco juega un doble papel en la regulación de la homeostasis energética. Por un lado, la regulación del metabolismo del TAB está dirigida hacia un eficiente almacenamiento y liberación de los lípidos dependiendo de las necesidades del organismo, de tal manera que actúa almacenando el exceso de energía en forma de triglicéridos en situaciones de exceso energético o movilizándolo los mismos en situaciones de demanda energética como el ayuno, el ejercicio, la gestación y la lactancia (302). Por otro lado y como ya se ha descrito previamente (apartado 2.3), el TAB actúa como un órgano endocrino liberando y secretando adipocitoquinas que interactúan con múltiples tejidos diana implicados en el metabolismo energético como el hígado, el músculo o el cerebro (301).

El TAM por su parte, está especializado en la liberación de energía en forma de calor, a través de la termogénesis adaptativa, proceso generado como respuesta a la exposición al frío o a una dieta hipercalórica (303,304). Los adipocitos marrones son células poligonales con un núcleo central redondeado que disponen de un abundante citoplasma y múltiples gotas lipídicas dispersas a lo largo del mismo. Su alta capacidad termogénica se debe a la presencia de abundantes mitocondrias junto a la elevada expresión de enzimas de la cadena respiratoria y de la oxidación de ácidos grasos que contribuyen a su alta capacidad oxidativa y a la expresión de la proteína desacoplante UCP-1 (304). Además, el TAM está ampliamente innervado por el sistema nervioso simpático (SNS), hecho que le confiere una gran capacidad de respuesta a la estimulación adrenérgica, de gran relevancia en la función termogénica (305).

El tejido adiposo marrón en roedores se encuentra localizado a nivel interescapular mientras que en humanos adultos no presenta una localización homogénea. El hecho de que el depósito interescapular desapareciese rápidamente después del nacimiento, conservándose únicamente pequeños agregados celulares en esta región, llevó a considerar al TAM como carente de función fisiológica en humanos. Sin embargo, estudios recientes empleando la tecnología de tomografía por emisión de positrones (PET, *positrón emission tomography*) han demostrado la presencia de TAM plenamente funcional en humanos adultos, localizado fundamentalmente en la región supraclavicular (306). Además, se ha descrito la presencia de adipocitos multiloculares a lo largo del tejido adiposo blanco en humanos y roedores con capacidad de expresar UCP-1, cuyo desarrollo se incrementa marcadamente en situaciones de exposición crónica al frío o tras una estimulación β -adrenérgica crónica (307-309). Estos adipocitos,

con características similares a los adipocitos marrones, tienen un origen distinto al de las células adiposas que conforman el TAM interescapular pues carecen del factor de transcripción Myf5, característico de las células progenitoras que dan lugar a estas últimas (310,311). Diversos estudios han demostrado que la proporción de la presencia de este tipo celular en el TAB tiene un impacto fundamental en el balance energético global del organismo. Así, su incremento es una característica de ciertas cepas de ratones resistentes a la obesidad inducida por la dieta y la obesidad en humanos está relacionada con una reducida expresión de UCP-1 y otros genes relacionados con la termogénesis en el TAB (312) (Fig.6).

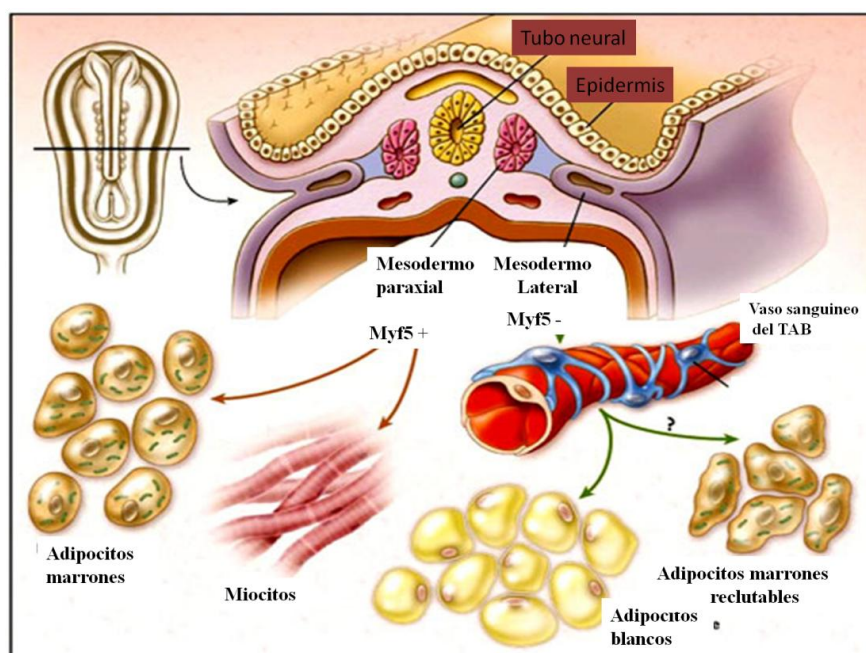


Figura 6. Origen celular del tejido adiposo marrón.

4.2.1 Termogénesis adaptativa y tejido adiposo marrón

Desde que en 1961, Eric G. Ball y Robert L. Jungas (313) propusieron las propiedades termogénicas del tejido adiposo marrón, numerosos trabajos han mostrado la capacidad de este tejido para responder a diversos estímulos ambientales, generando calor a partir de la energía metabólica almacenada.

La mitocondria es un orgánulo presente en el citoplasma de las células eucariotas, encargado de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular mediante el proceso denominado fosforilación oxidativa (314). Las mitocondrias están rodeadas por dos membranas: una externa y lisa, permeable a metabolitos pequeños y

una interna fuertemente plegada, de permeabilidad mucho más restringida, y que envuelve a la matriz mitocondrial. Las rutas metabólicas del catabolismo celular (el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la β -oxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los aminoácidos) conducen a la síntesis de los donadores de electrones NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) y FADH₂ (flavin adenina dinucleótido). Estos sustratos, en la matriz mitocondrial, donan sus electrones a una serie de proteínas localizadas en la membrana mitocondrial interna y agrupadas en complejos que constituyen la cadena de transporte de electrones mitocondrial (314) (Fig. 7).

Durante la fosforilación oxidativa, los protones regresan a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa y la energía de este gradiente electroquímico es utilizada para la síntesis de ATP. Sin embargo, algunos protones regresan a la matriz mitocondrial por otras vías independientes de la ATP sintasa, provocando una disminución del gradiente electroquímico y mucha de la energía almacenada de este gradiente es liberada en forma de calor. A la disociación entre la respiración y la síntesis de ATP se le denomina desacoplamiento mitocondrial. La importancia fisiológica de esta fuga de protones se refleja en el hecho de que supone el 38% de la tasa metabólica basal de la rata (315).

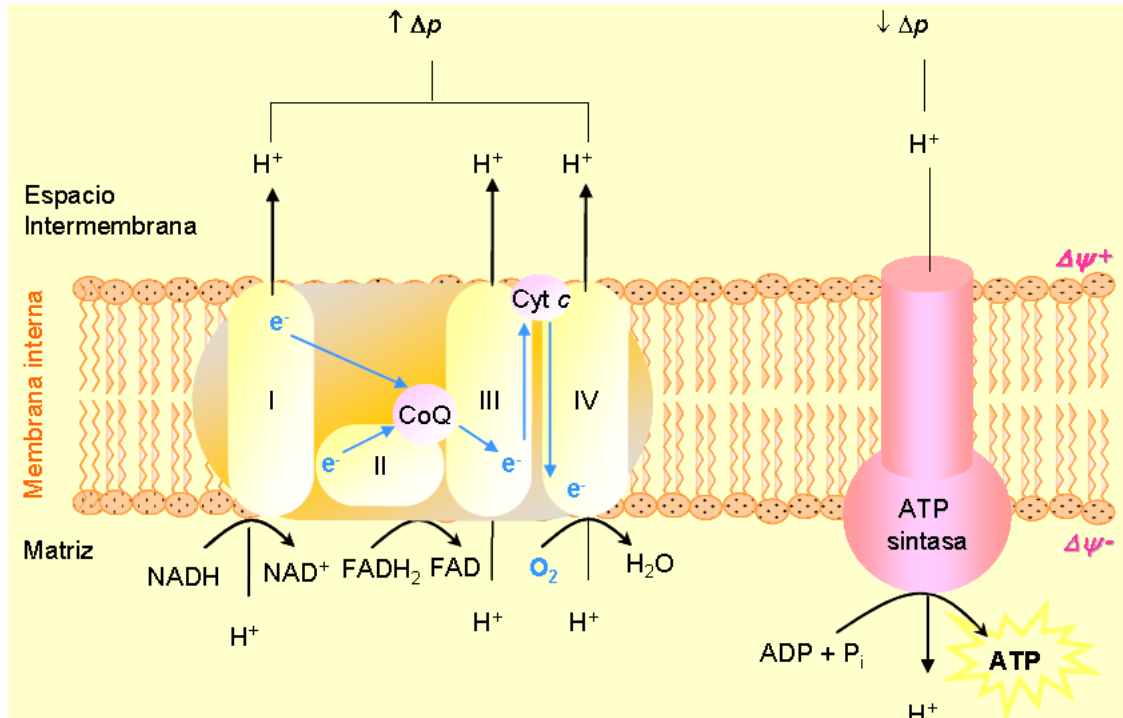


Figura 7. Esquema de la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa en la membrana mitocondrial interna. Asociado al flujo de electrones (e^-) se crea un gradiente de protones (p) a ambos lados de la membrana mitocondrial interna que es utilizado por la ATP sintasa para la síntesis de ATP en la matriz mitocondrial a partir de ADP y fósforo inorgánico (Pi).

La conductancia basal determina la difusión no catalizada de iones a través de la membrana mitocondrial interna y se encuentra altamente relacionada con la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la misma (315). Sin embargo, otro factor que condiciona este parámetro, además del área de la superficie de la membrana interna y su composición, es la presencia en la misma de determinadas proteínas denominadas genéricamente proteínas desacoplates. Estas proteínas en presencia de determinados compuestos activadores como el radical superóxido y el compuesto 4-hidroxinonenal incrementan la conductancia de protones en un fenómeno conocido como conductancia inducida (316).

4.2.1.1 La proteína desacoplante UCP-1

La primera proteína desacoplante identificada fue la termogenina o UCP-1, característica del tejido adiposo marrón (317) donde ejerce su función fisiológica en la termogénesis adaptativa.

El principal modulador de la termogénesis adaptativa en el TAM es el sistema nervioso simpático que inerva masivamente este tejido. En respuesta a una disminución de la temperatura ambiental, la estimulación del sistema nervioso simpático, provoca un aumento de la liberación de noradrenalina que al unirse a los receptores adrenérgicos β_3 en la membrana de los adipocitos marrones activa la vía del AMP cíclico/proteína quinasa A, que estimula finalmente la lipólisis de los triglicéridos almacenados en este tejido, liberando glicerol y ácidos grasos (297). Estos ácidos grasos, bien actuando como co-factores en el transporte de protones, siendo transportados como aniones a la matriz mitocondrial (318) o bien provocando un cambio conformacional en UCP-1 (319), estimulan la actividad de esta proteína, que resulta en la disipación de energía en forma de calor. Además, se produce un aumento del flujo de sangre al TAM que experimenta una expansión hiperplásica e hipertrófica e incrementa la captación de lípidos e hidratos de carbono con destino al metabolismo oxidativo, amplificando de esta manera su capacidad termogénica (320). Por otro lado, además del mantenimiento de la temperatura corporal, el tejido adiposo marrón juega un papel importante en el control del peso corporal mediante la disipación en forma de calor de parte de la energía aportada por la dieta (termogénesis adaptativa inducida por la dieta) y se ha postulado como un mecanismo de protección frente a la excesiva acumulación de energía en situaciones de balance energético positivo (321). De hecho, la ingesta de alimentos de

alto contenido calórico incrementa la actividad del sistema nervioso simpático (SNS) que inerva el TAM, y estimula la termogénesis (322). Así, animales sometidos durante largos periodos de tiempo a dietas hipercalóricas presentan hipertrofia de este tejido que presenta elevados niveles de proteína y ARNm de UCP-1 (298). Por el contrario, en situaciones de ayuno o de dieta hipocalórica (323) se produce una disminución de los niveles de UCP-1 con la consecuente inhibición de la termogénesis.

El desarrollo y la caracterización del ratón deficiente en UCP-1(324) constituyeron un avance clave en el estudio del papel de esta enzima en la termogénesis adaptativa. En experimentos de exposición al frío (5°C) empleando este modelo, se demostró que estos ratones eran incapaces de mantener su temperatura corporal, lo que implica que la termogénesis mediada por UCP-1 en el TAM es fundamental para mantener la eutermia (324). Sin embargo, paradójicamente estos animales no desarrollaban obesidad e incluso mostraban resistencia a la dieta rica en grasas cuando se encontraban en condiciones ambientales de 20-22 °C, lo que llevó a cuestionar la importancia de esta proteína en la termogénesis inducida por la dieta (324). Esta observación llevó a postular la existencia de un mecanismo de compensación, atribuyéndose dicho papel a la proteína desacoplante UCP-2, cuyos niveles se muestran elevados en el tejido adiposo marrón únicamente en ausencia de UCP-1. Otro factor que podría estar implicado en la resistencia a la obesidad de este modelo, como se demostró posteriormente, era el estrés térmico al que estaban sometidos estos animales, que aumentaba su metabolismo basal alrededor de un 50%. Con el objetivo de explicar las posibles causas del fenotipo no obeso de este modelo se llevaron a cabo diversos estudios en los que los ratones deficientes en UCP-1 eran mantenidos en condiciones ambientales de termoneutralidad (30 °C, libre de estrés térmico). En este contexto, los ratones UCP-1 KO, bajo alimentación estándar, aumentan su peso corporal respecto a sus controles, efecto que se magnifica cuando son mantenidos con dieta rica en grasas. Además, este modelo presenta una mayor eficiencia metabólica que los ratones control, puesto que estos animales ganan más masa corporal ingiriendo las mismas calorías que éstos últimos (325). Por otro lado, en estas condiciones ambientales, los ratones de genotipo salvaje alimentados con dieta rica en grasa, muestran un aumento de los niveles de noradrenalina, con la consecuente estimulación adrenérgica de la termogénesis adaptativa, efecto que no se observa en ausencia de UCP-1, lo que demostró que la termogénesis inducida por la dieta depende directamente del incremento de la actividad de UCP-1 en respuesta a la estimulación del SNS (325).

4.2.1.2 Regulación transcripcional de UCP-1, termogénesis adaptativa y biogénesis mitocondrial

La regulación de la síntesis de UCP-1 ocurre principalmente a nivel transcripcional, y aunque el principal regulador de este proceso es la estimulación noradrenérgica del TAM, varios receptores nucleares que se unen al promotor de UCP-1 modulan, además de la expresión de esta proteína, el proceso de diferenciación adipocitaria, incluyendo: los receptores activados por proliferadores peroxisomales γ y α (PPAR γ y PPAR α), el receptor X de retinoides (RXR) y el receptor de hormonas tiroideas (TR) (304).

En el promotor del gen de UCP-1, se han identificado varios elementos de respuesta a AMP cíclico (CREs) localizados, tanto en la región proximal del promotor, como en una región activadora (*enhancer*) más distal. Así, como se ha mencionado anteriormente, la elevación de los niveles de AMPc tras la estimulación β -adrenérgica, aumenta la actividad de PKA, que a su vez fosforila CREB que al unirse al elemento de respuesta a AMPc estimula la transcripción de UCP-1 (326). En la región activadora distal se encuentran además, los sitios de unión para los receptores nucleares PPAR, RXR y TR β , que para su unión al promotor forman heterodímeros (PPAR/RXR y TR β /RXR) y necesitan de un co-factor para poder estimular la transcripción de UCP-1 (326-328). Esta función es ejercida por PGC-1 α (coactivador de PPAR γ), como demuestra el hecho de que su co-expresión con ambos heterodímeros estimula marcadamente la activación transcripcional del promotor de UCP-1 (329) (Fig. 8).

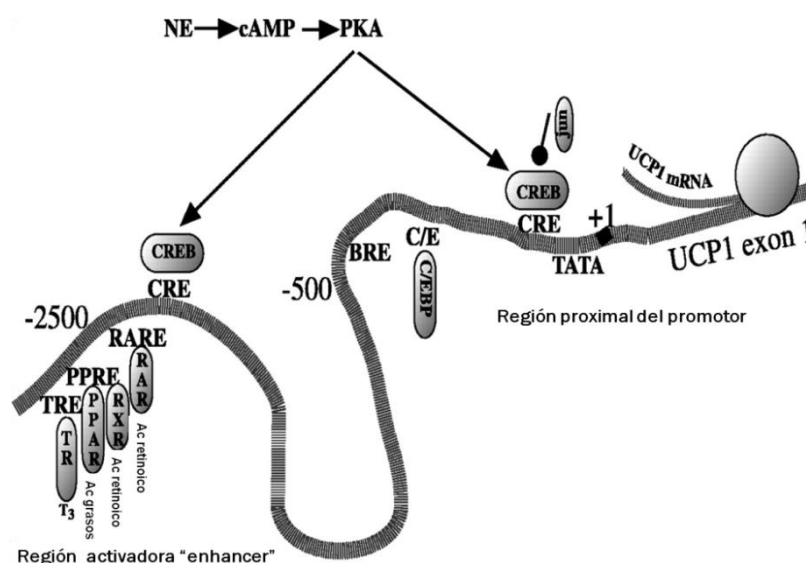


Figura 8. Regulación transcripcional del gen de UCP-1. Modificado de Cannon B. 2004, Physiol Rev.; 84(1):277-359

Aunque PPAR γ juega un papel clave en el proceso de adipogénesis en concierto con la familia de factores de transcripción nuclear C/EBP (proteína de unión a CCAAT/enhancer), la diferenciación de una célula precursora hacia adipocito blanco o marrón es dependiente de PGC-1, que interacciona con distintos factores de transcripción mitocondriales incrementando la tasa de transcripción de genes implicados en el proceso de la biogénesis mitocondrial, la oxidación de ácidos grasos, la termogénesis y la respiración mitocondrial (330).

El PPAR γ es el único miembro de la superfamilia de receptores nucleares (PPARs) que se expresa específica y abundantemente en el tejido adiposo, y es imprescindible en el proceso adipogénico, así como para una correcta sensibilidad a la insulina (331). De esta manera, las tiazolidinedionas (TZD), fármacos antidiabéticos que fueron originalmente identificados como ligandos de PPARs pero que también actúan estimulando su expresión, incrementan el número de adipocitos que expresan el transportador de glucosa GLUT-4, así como la expresión de genes lipogénicos en el TAB, reduciendo de este modo los niveles de ácidos grasos libres en circulación y favoreciendo por tanto la sensibilidad a la insulina (332).

El gen de PPAR γ codifica para dos isoformas proteicas que son PPAR γ 1 y PPAR γ 2. La isoforma PPAR γ 1 se expresa en diferentes tejidos y tipos celulares como tejido adiposo blanco y marrón, células β pancreáticas, músculo esquelético, hígado, macrófagos, colon, hueso y placenta (333). Sin embargo, la isoforma PPAR γ 2, se encuentra en condiciones basales exclusivamente en tejido adiposo tanto blanco como marrón, y es regulada a nivel transcripcional por el estado nutricional. De las dos isoformas descritas, PPAR γ 2 es la que presenta una mayor capacidad adipogénica, y dada su expresión ectópica en hígado y músculo esquelético en respuesta a estados de sobrealimentación o en modelos de obesidad genética, se ha asociado al desarrollo de la lipotoxicidad y resistencia a la insulina en esos tejidos (334). La relevancia de PPAR γ respecto a la homeostasis energética global se demuestra por el hecho de que la inhibición de la expresión del gen que codifica para ambas isoformas da lugar a letalidad embrionaria y a fallo del desarrollo placentario (335), lo que hace inviable su estudio en la etapa adulta. Sin embargo, y como alternativa, se han desarrollado distintos modelos de animales transgénicos que han contribuido a evaluar las acciones de PPAR γ y a diseccionar su papel en la regulación del metabolismo lipídico en distintos tejidos. Así, en ratones heterocigotos para una mutación dominante negativa de PPAR γ , que muestran un desarrollo y una sensibilidad a la insulina normal, presentan una

distribución de grasa corporal anormal, con un menor contenido de TAM interescapular y depósito de grasa abdominal, y una mayor acumulación de grasa subcutánea (336). Distintos autores han evaluado el efecto de la delección tejido-específica de PPAR γ en tejido adiposo e hígado. En resumen, los resultados de estos estudios indican que este factor de transcripción es esencial para el correcto depósito de triglicéridos en el tejido adiposo, además de favorecer su captación y síntesis de novo a nivel hepático en situaciones de sobrecarga de lípidos en la dieta, previniendo de esta manera su acumulación ectópica en otros tejidos como el músculo, en el que favorece la oxidación de los mismos. Por último y como era de esperar, la ablación de PPAR γ 2 se asocia al desarrollo de una marcada lipodistrofia y una disminución de la sensibilidad a la insulina, aunque este último efecto parece ser género-específico al ser evidente sólo en ratones hembra (336).

Además de PPAR γ , en la diferenciación adipocitaria participan otros factores de transcripción miembros de la familia C/EBPs que engloba diferentes proteínas nucleares capaces de reconocer y unirse a una determinada secuencia de ADN (CCAAT), presente en los promotores de algunos genes, promoviendo su expresión transcripcional (337).

Esta familia presenta tres miembros que se expresan en el tejido adiposo: C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ (338). C/EBP α es uno de los principales reguladores del proceso de diferenciación, tanto en adipocitos blancos como en marrones, como demuestran diferentes estudios en los cuales la eliminación de C/EBP α da lugar a la inhibición de la diferenciación terminal de los adipocitos (339). Otro dato que pone de manifiesto la importancia de C/EBP α en la adipogénesis es la presencia de lugares de unión para C/EBP α en los promotores de diversos genes característicos de los adipocitos maduros entre los que se encuentra PPAR γ . Tanto C/EBP β como C/EBP δ aparecen en la fase temprana de diferenciación del preadipocito y su principal función es iniciar la activación de C/EBP α , aunque también juegan un importante papel en la inducción de PPAR γ (340). De hecho, su expresión ectópica provoca un incremento en los niveles de PPAR γ equivalente al de las células adiposas, que permite la diferenciación de preadipocitos incluso en ausencia de estímulos hormonales (341,342). Por último, la síntesis de PPAR γ puede ser estimulada de modo independiente a C/EBPs, a través de SREBP1c que es capaz además de aumentar la actividad transcripcional de PPAR γ , incluso en ausencia de sus ligandos activadores (343).

Sin embargo, una vez puesto en marcha el proceso de adipogénesis será el inicio de la transcripción de UCP-1 durante la diferenciación del preadipocito, el que decante a éste

hacia la forma de adipocito marrón, considerándose a esta proteína desacoplante como un marcador de la diferenciación terminal de este tipo celular. Como ya se mencionó con anterioridad, PPAR γ es el principal modulador transcripcional que promueve la expresión de UCP-1, ejerciendo su acción a través de la unión a su coactivador PGC-1 α , de una manera independiente de ligando (329). Así, la actividad de PGC-1 α está estrechamente asociada al fenotipo del adipocito marrón donde se expresa profusamente. Por un lado PGC1 α es un potente regulador de la actividad y de la expresión génica de UCP-1 favoreciendo la actividad transcripcional de PPAR γ y del receptor de T3 sobre el promotor de UCP-1. Asimismo, y apoyando el papel de este factor de transcripción como diferenciador de los adipocitos blancos y marrones, se ha demostrado que la expresión ectópica de PGC-1 α en cultivos de adipocitos blancos induce la expresión no sólo de UCP-1 sino también de otros genes implicados en el metabolismo del TAM, como distintas enzimas implicadas en el proceso de oxidación de ácidos grasos y en la cadena respiratoria (344). La producción de este factor de transcripción se activa en respuesta a estimulación adrenérgica, y por tanto es regulada por AMPc, además de ser inducible por el frío y por estados de exceso calórico (345), evidencias que sugieren la posible implicación de este co-activador en la termogénesis adaptativa. Sin embargo, la termogénesis adaptativa es un proceso mucho más complejo que la simple activación del desacoplamiento mitocondrial. De hecho, otros componentes importantes a tener en cuenta son el aumento del número de mitocondrias (biogénesis mitocondrial) y la actividad del sistema de transporte electrónico en estas mitocondrias (346). Así, el incremento de la expresión de PGC-1 α es paralelo al aumento de ADN mitocondrial y a la expresión de genes del sistema OXPHOS (fosforilación oxidativa), sugiriendo la participación de este co-activador en la regulación de la biogénesis mitocondrial en el TAM (347) (Fig. 9).

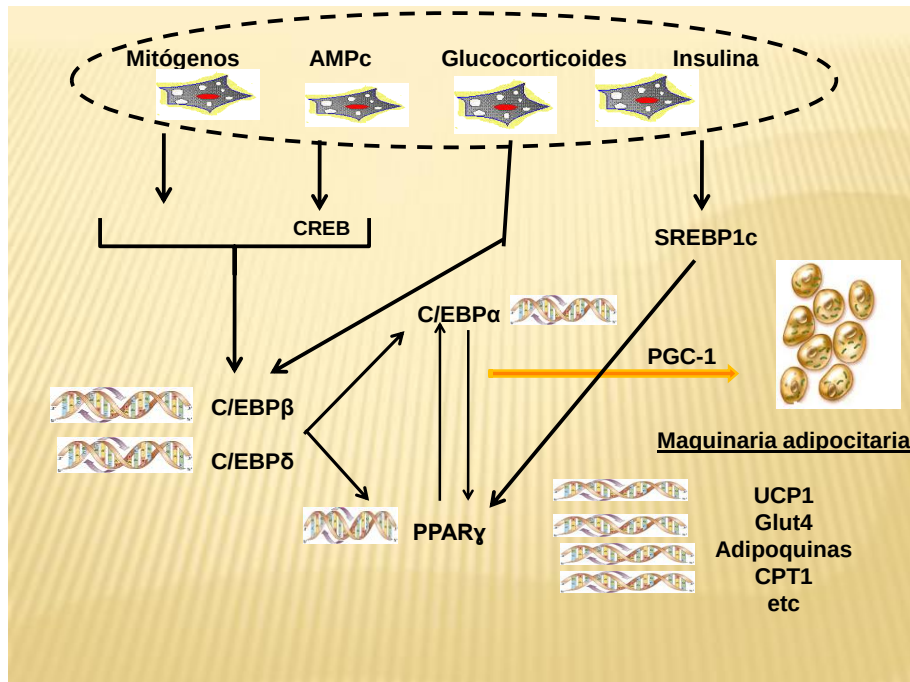


Figura 9. Adipogénesis del tejido adiposo marrón

El control de la biogénesis mitocondrial en el tejido adiposo marrón, requiere la integración de múltiples factores de transcripción que determinan la expresión coordinada de genes mitocondriales y nucleares implicados en la producción de energía (348) como los factores nucleares, factor respiratorio nuclear tipo 1 (NRF-1) y GABPA (homólogo de la forma humana NRF-2). NRF-1 y NRF-2 participan en la regulación de diversos genes relacionados tanto con el programa biogénico, como con la función respiratoria mitocondrial, incluyendo al factor de transcripción mitocondrial tipo A (TFAM), factor considerado como regulador directo de la replicación y transcripción del ADN mitocondrial; a las dos isoformas de la proteína TFB (TFB1M y TFB2M), que ponen en contacto a esta última con la ARN-polimerasa mitocondrial; y a las subunidades que codifican para los cinco complejos respiratorios (348). PGC-1 α es un potente activador de ambos aspectos del programa termogénico a través de dos vías: 1) como inductor de la expresión de (NRF-1) y (NRF-2) y 2) al unirse a NRF-1 y NRF-2 co-activando su función transcripcional sobre TFAM, TFB1M y TFB2M promoviendo de este modo la diferenciación mitocondrial y la expresión de enzimas esenciales de la cadena respiratoria (349) (Fig.9). A este respecto estudios in vitro, han demostrado que la mutación dominante negativa de los sitios de unión para NRF-1 en el promotor de TFAM se traduce en la abolición del efecto de PGC-1 α sobre la biogénesis

mitocondrial, mientras que una mutación similar en el lugar de unión para NRF-2 produce un efecto mucho menos marcado (348)

Otro factor relacionado con el papel activador de PGC-1 α sobre la biogénesis mitocondrial es el receptor relacionado con el receptor estrógenos α (ERR α). Este factor de transcripción pertenece a la familia de receptores nucleares huérfanos ERR, que incluye además a ERR β y γ , identificados en virtud de su homología con el receptor de estrógenos aunque carecen de capacidad de unión a los mismos (350). La expresión de ERR α es elevada en tejidos de alta capacidad oxidativa como riñones, corazón y tejido adiposo marrón, donde actúa como regulador de la β -oxidación estimulando la expresión de la deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena media (MCAD) y de CPT-1 β . Confirmando su papel en la regulación del metabolismo lipídico y en la termogénesis adaptativa, los ratones deficientes en este factor de transcripción presentan un reducido contenido de grasa corporal, son resistentes a la obesidad inducida por la dieta y presentan una reducida capacidad termogénica del TAM, asociada a una disminución de los niveles de expresión de proteínas clave en la fosforilación oxidativa, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en la oxidación de ácidos grasos en este tejido (351). ERR α es un gen diana temprano de PGC-1 α , que además de inducir marcadamente su expresión, actúa como su co-activador (352). Análisis computacionales de la secuencia y patrón de expresión de NRF-2 y ERR α , así como de sus genes diana, sugieren que la inducción de la expresión de ambos por PGC-1 α es anterior a NRF-1 en el programa de activación transcripcional de genes de la cadena respiratoria (353) (Fig.10).

Otro miembro de la familia de receptores activados por proliferadores peroxisomales, identificado en virtud de su homología con PGC-1 α , es PGC-1 β que se expresa en tejidos de alta capacidad oxidativa como el TAM y el músculo pero que al contrario de lo que ocurre con PGC-1 α no es inducible por el frío (354). Sin embargo aunque los ratones PGC-1 β KO son capaces de mantener su temperatura corporal cuando son expuestos a bajas temperaturas, su gasto energético basal tanto en condiciones de termoneutralidad como tras la exposición al frío es reducido, lo que sugiere una capacidad termogénica del TAM disminuida. De hecho, aunque la expresión de PGC-1 α se encuentra elevada en el TAM de estos animales, no así la expresión de proteínas de la cadena respiratoria que por el contrario se encuentran inhibidas (355).

Sin embargo, aunque la acción estimuladora de PGC-1 β sobre la biogénesis mitocondrial es también mediada por la interacción con NRF-1 y ERR α , se ha descrito que la sobre-expresión en miocitos de PGC-1 α está ligada a una mayor proporción de pérdida de protones en la respiración mitocondrial (desacoplamiento) que la sobre-expresión de PGC-1 β en el mismo tipo celular (356).

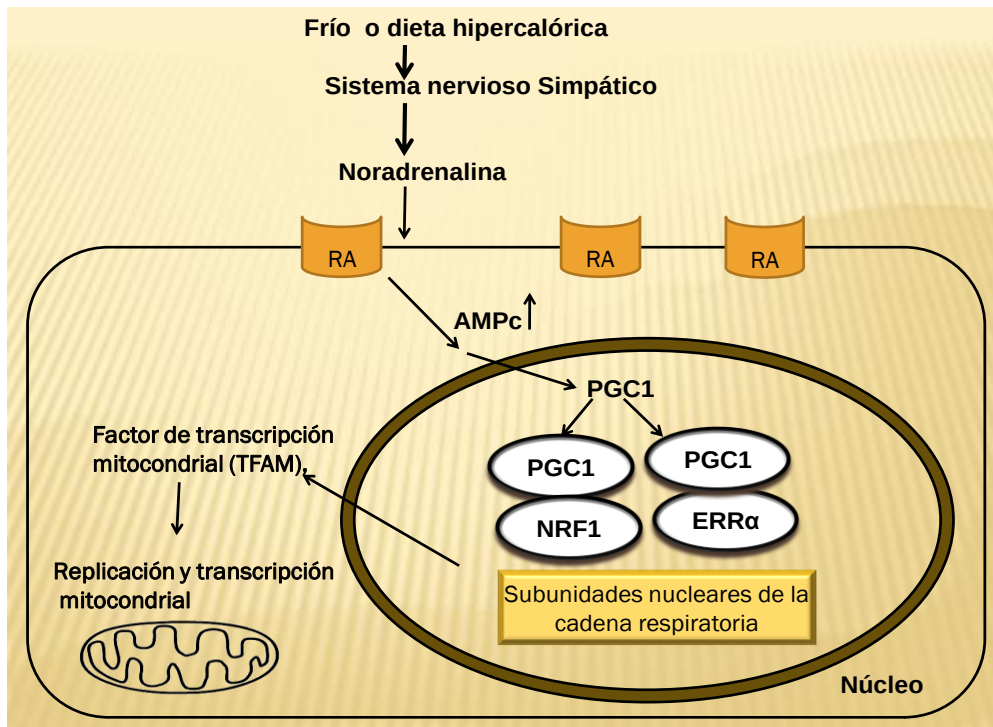


Figura 10. Estimulación de la biogénesis mitocondrial

4.2.1.3 Otras proteínas homólogas de UCP-1

Además de la UCP-1 se ha descrito la existencia de hasta cinco miembros dentro de la familia de las proteínas desacoplantes (UCP1-5) reconocidos en función de su homología estructural con UCP-1. Entre estos miembros de la familia de UCPs, destacan tanto UCP-2 como UCP-3 por su gran homología con UCP-1 (357).

La proteína UCP-3 se expresa mayoritariamente en músculo esquelético y en el TAM, y su expresión es modulada por hormonas tiroideas en el músculo esquelético y por el frío en el TAM y en músculo (358). Debido a su analogía secuencial y estructural con UCP-1 se ha propuesto que podría desempeñar un papel en la termogénesis facultativa aunque la función termogénica de esta proteína no está tan clara como en el caso de UCP-1.

Al igual que UCP-1, UCP-3 se encuentra fuertemente regulado a nivel transcripcional y factores como los ácidos grasos (359), la dieta (360), el ejercicio (361) y el ayuno (362) inducen un marcado aumento en la expresión de UCP-3 en el músculo esquelético.

Sin embargo, existen numerosas evidencias que apuntan a que la principal función de UCP-3 se encuentra asociada al metabolismo de los ácidos grasos (363) más que a la disipación de energía en forma de calor. Así, en situaciones en las que aumentan los niveles de ácidos grasos, como el ayuno (362), o durante una alimentación con dieta rica en grasas (360) se elevan los niveles de ARNm de UCP-3. Asimismo, el aumento de ácidos grasos a nivel plasmático asociado al ejercicio agudo estimula la expresión de ARNm de UCP-3. Por el contrario, el ejercicio regular, que incrementa la capacidad β -oxidativa, reduce el contenido de UCP-3. Estos datos experimentales llevaron a postular el posible papel de UCP-3 en la exportación de los aniones o los grupos peróxido resultado de la oxidación de ácidos grasos como mecanismo de prevención del daño mitocondrial (364). Apoyando esta hipótesis los ratones deficientes en UCP-3 no presentan alteraciones en el peso corporal, en la tolerancia al ejercicio, así como tampoco en la oxidación de los ácidos grasos, ni en la termogénesis inducida por el frío. Sin embargo, a pesar de no afectar a estos parámetros la ausencia de UCP-3 da lugar a una respiración mitocondrial más acoplada en el músculo esquelético, demostrando por tanto la actividad desacoplante de esta proteína al menos a nivel de este tejido. Además, la deficiencia en UCP-3 se relaciona con una mayor producción de ROS, sugiriendo que una de las posibles funciones de UCP-3 podría ser prevenir el estrés oxidativo en el músculo esquelético (365,366).

Por su parte, la proteína UCP-2, tiene una amplia distribución en tejidos, incluyendo músculo esquelético, tejido adiposo blanco y corazón (367). Los ratones knock-out de UCP-2 no desarrollan un fenotipo obeso, ni tienen un reducido gasto energético basal o una reducida sensibilidad al frío, lo que parece indicar la ausencia de función termogénica de UCP-2 (368).

Posteriormente, se han descrito otros miembros de la familia de UCPs que se denominaron UCP-4 y UCP-5 cuya homología con UCP-1 es del 29% y del 34% respectivamente, y cuya función principal aunque no del todo esclarecida parece ser el transporte de protones (369).

4.2.2. Metabolismo lipídico

La grasa constituye la principal forma de almacenamiento de energía en los mamíferos, y numerosos órganos y tejidos están implicados en su metabolismo, siendo los más importantes el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado. Cada uno de estos tejidos tiene la capacidad de almacenar triglicéridos que pueden ser hidrolizados para la liberación de ácidos grasos. En el caso del tejido adiposo, estos ácidos grasos pueden ser liberados a la circulación para su utilización por otros tejidos, mientras que en el músculo son oxidados y, en el hígado, son re-esterificados en forma de triglicéridos que serán secretados en lipoproteínas de muy baja densidad (370).

Gran parte de los lípidos de la dieta se encuentran en forma de triglicéridos que se hidrolizan en el intestino por acción de diferentes lipasas dando lugar a diacilglicéridos, monoacilglicéridos y ácidos grasos. Los ácidos grasos, son absorbidos por las células de la mucosa intestinal, y posteriormente se re-esterifican dando lugar de nuevo a triglicéridos. Éstos, junto con el colesterol de la dieta, fosfolípidos y ciertas apoproteínas, entre las que se encuentra apoCII, forman los quilomicrones. Estas lipoproteínas, salen de la mucosa intestinal hacia el sistema linfático, desde donde son drenados a la circulación sanguínea (371). La apoCII activa a la LPL que es sintetizada en la superficie de las células endoteliales de los capilares del tejido adiposo y muscular. Esta enzima hidroliza los triglicéridos en glicerol, que es captado por el hígado, y en ácidos grasos, que son captados por el tejido adiposo y en menor medida por el músculo (372). Una vez en el interior de las células grasas, los ácidos grasos se re-esterifican y son almacenados en forma de triglicéridos (lipogénesis), que son el producto final de una reacción en múltiples etapas modulada por la proteína estimulante de la acilación (ASP) que acelera la síntesis de los mismos (373). La última etapa de formación de triglicéridos, catalizada por la enzima diacilglicerol transferasa (DGAT), implica la formación de un enlace éster entre un acil CoA graso y el grupo hidroxilo libre de un diacilglicerol (374).

4.2.2.1. Síntesis de Ácidos Grasos

En estados en los que se presenta un exceso de glúcidos en la dieta o en los que la demanda de ATP es baja, el organismo es capaz de almacenar dicho excedente en forma de lípidos. De esta manera, en la mitocondria, a partir de los excedentes de glucosa se obtiene citrato a través del ciclo del ácido cítrico. Este citrato es transportado hasta el citosol gracias a la acción de la ATP-citrato liasa que lo transforma en acetil-CoA y

oxalacetato. Este acetil-CoA es el sustrato de la acetil CoA carboxilasa (ACC) que cataliza el primer paso de la biosíntesis de ácidos grasos. En esta etapa se produce la carboxilación del acetil-CoA dando lugar a la formación de malonil-CoA.

En mamíferos se ha descrito la existencia de dos isoformas de la enzima ACC, codificadas por genes diferentes: ACC1 y ACC2. La isoforma ACC1, proteína citosólica de 265 KDa, se expresa en tejidos con una mayor capacidad lipogénica como el tejido adiposo y el hígado. Mientras que la isoforma ACC2, proteína de 280 KDa anclada en la membrana mitocondrial externa, se expresa en tejidos, como el músculo esquelético o cardíaco, que carecen de síntesis lipídica y en los que la oxidación de ácidos grasos es fundamental como fuente de energía (375).

La actividad de ACC y la tasa de síntesis de ácidos grasos en tejidos de alta actividad metabólica fluctúan rápidamente en respuesta a diversos estímulos como cambios en el estado nutricional, relacionados o no con modificaciones en la sensibilidad a la insulina, y estados fisiológicos como la lactancia (376). El control de la actividad de ACC es ejercido a corto plazo a través de diversos metabolitos y mediante la fosforilación reversible de esta proteína. Sin embargo la regulación a largo plazo de la actividad de esta enzima se realiza a través de mecanismos tanto transcripcionales como post-transcripcionales. La abundancia del ARNm de ACC-1 varía en concierto con los niveles de expresión de otras enzimas de la ruta lipogénica como por ejemplo FAS y la ATP-citrato liasa, y en cierta medida con los niveles de ARNm de ciertos componentes de rutas metabólicas relacionadas como la glucólisis y la síntesis de fosfolípidos y colesterol (377). Por otro lado la actividad enzimática de ACC es activada e inhibida alostéricamente por el citrato y por ácidos grasos de cadena larga (LCFA-CoAs), respectivamente (378). Además, su propio sustrato malonil-CoA inhibe la actividad de esta enzima de forma competitiva. Por último otro mecanismo de regulación de su actividad es la fosforilación de la misma en distintos residuos serina de su secuencia peptídica (379). Aunque se han identificado siete lugares de fosforilación en la molécula de ACC, únicamente la fosforilación por AMPK de la serina 79 y de la serina 1200 por PKA parecen inhibir la actividad de esta enzima in vivo en respuesta a cambios en el tono simpático, en los niveles circulantes de diferentes factores que reflejan el estado energético del organismo como entre otros leptina, insulina, glucagón, hormonas tiroideas y adiponectina (379).

Las primeras evidencias de que la inhibición de la actividad de ACC podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico surgieron

del estudio del análogo de ácidos grasos de cadena larga ácido 5-(tetradeciloxi)-2-furancarboxílico (TOFA). Así, se demostró que la inhibición de la actividad de ACC, a través del tratamiento con este compuesto, tenía la capacidad de reducir la tasa de síntesis y secreción de ácidos grasos en hepatocitos en cultivo y de disminuir los niveles circulantes de triglicéridos y colesterol, además del peso corporal en distintos modelos animales (380). Sin embargo, la falta de especificidad de TOFA, cuyos efectos podrían estar mediados por la modulación de la actividad de otras enzimas, además de ACC, que utilizan ácidos grasos de cadena larga como sustrato, lo que llevó al desarrollo y validación de diversos fármacos con acciones inhibitorias de ACC. En general la administración de estos compuestos en ratas, que actúan sobre las dos isoformas de la enzima, disminuye significativamente los niveles de malonil-CoA tanto en tejido hepático y muscular como cardíaco, con la consiguiente reducción de la tasa de síntesis de triglicéridos e incremento de la oxidación de ácidos grasos (381). Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia funcional de malonil-CoA en la regulación del metabolismo lipídico y por extensión en la regulación del peso corporal puesto que este metabolito, además de servir como sustrato de la biosíntesis de ácidos grasos, regula su oxidación al inhibir la actividad de la enzima CPT-1 (apartado 4.2.2.3 de la introducción).

En la siguiente etapa biosintética, la enzima ácido graso sintasa (FAS) cataliza una serie de reacciones encadenadas que comienzan con la condensación de malonil-CoA y acetil-CoA, y dan lugar en último término a la formación del ácido graso saturado palmitato y en menor medida a otros ácidos como por ejemplo el estearato y el mistirato. Este complejo enzimático, estructurado como un homodímero con siete dominios catalíticos necesarios para el desarrollo de las reacciones de iniciación, elongación y liberación de la cadena de ácido graso, se expresa abundantemente en tejidos lipogénicos como el hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria durante la lactancia (382). La regulación de la actividad de esta enzima tiene lugar principalmente a nivel transcripcional. El efecto del estado nutricional sobre los niveles de ARNm de FAS en tejidos periféricos es conocido desde hace décadas (383). Así, mientras el ayuno en ratas disminuye su expresión a nivel del tejido adiposo y el hígado, la re-alimentación con dietas ricas en carbohidratos incrementa marcadamente la actividad de esta enzima, siendo este efecto mucho menor en respuesta a una dieta rica en grasas. Los efectos de un incremento de la ingesta de carbohidratos sobre la expresión de FAS son mediados por una elevación de los niveles circulantes de insulina, que estimula no

sólo la expresión de ésta, sino también de otras enzimas de la vía de síntesis de ácidos grasos como la ya mencionada ACC y la esteroil CoA desaturasa-1 (SCD-1) (384). Un mediador clave de las acciones de insulina sobre estas enzimas lipogénicas y, especialmente en la regulación de la expresión de FAS, es el factor de transcripción SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein1c) (385). La expresión de esta proteína, miembro de la familia de los factores de transcripción SREBP responsables de la activación transcripcional de cascadas de señalización esenciales para la síntesis endógena de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos, es prácticamente ubicua tanto en humanos como en roedores siendo especialmente abundante en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético, donde es estimulada por insulina (385).

Finalmente el palmitato, ácido graso de 16C, sufre una serie de elongaciones para dar lugar a ácidos grasos saturados de cadena más larga como el ácido esteárico. Los ácidos grasos insaturados se producen por acción de desaturasas como la esteroil CoA desaturasa-1 (SCD-1) cuyos principales sustratos son el ácido esteárico (ácido graso saturado de 18C) y el palmitato catalizando su conversión en ácidos grasos monoinsaturados como el oleico (ácido graso de 18C) y el palmitoleico. Éstos son los principales ácidos grasos monoinsaturados que forman parte de los fosfolípidos de membrana, ésteres de colesterol, ceras y triglicéridos. La relevancia fisiológica de esta enzima en la regulación de la homeostasis energética quedó demostrada gracias al estudio de los ratones transgénicos deficientes en SCD-1 y ratones asebica (ratones ab^j y ab^{2j}) que presentan mutaciones espontáneas en el gen que codifica esta proteína (386). Estos animales presentan un fenotipo delgado hipermetabólico y resistente a la obesidad inducida por la dieta. Además, se ha demostrado que la deficiencia de esta proteína es capaz de atenuar el fenotipo obeso de los ratones ob/ob, mejorando tanto la sensibilidad a la insulina como las alteraciones en el perfil lipídico características de este modelo animal.

En conjunto la vital importancia de la vía de síntesis de ácidos grasos se refleja además en el hecho de que la mera ausencia de alguna de las enzimas de esta ruta metabólica en el ratón como ACC, FAS, ATP citrato liasa resulta letal, provocando la interrupción del desarrollo en etapas tempranas (387).

4.2.2.2. Lipolisis

Durante periodos de restricción calórica y/o de estrés los adipocitos a través del proceso de lipolisis liberan ácidos grasos y glicerol a partir de la hidrólisis de los triglicéridos, que conforman las gotas lipídicas distribuidas en su citoplasma. Estos ácidos grasos son rápidamente liberados al torrente sanguíneo siendo captados por tejidos como el músculo, donde serán utilizados como fuente de energía mediante el proceso de β -oxidación, o el hígado donde pueden ser oxidados, esterificados o convertidos en cuerpos cetónicos. La lipolisis es por tanto un proceso esencial en la regulación de la homeostasis energética, en la cual intervienen al menos tres enzimas específicas la monoglicérido lipasa (MGL), la triacilglicerol lipasa (*adipose triacilglycerol lipase*, ATGL) y la lipasa sensible a hormonas (LSH) (388). Aunque in vitro se ha demostrado que LSH, mediante su interacción con la proteína de unión a ácidos grasos FAB4 (*Fatty acid binding protein 4*), cataliza la hidrólisis tanto de triglicéridos a diacilglicéridos como de éstos a monoglicéridos, su actividad diacilglicerol lipasa es más importante (389). A pesar de la capacidad de LSH para hidrolizar el primer enlace éster de los triglicéridos, la lipasa ATGL juega un papel crucial en el suministro de diacilglicéridos como sustratos para la acción de LSH. De tal manera que, la acción conjunta de estas dos enzimas es responsable del 95% de la actividad triacilglicerol hidrolasa en el TAB murino (390). Por último aunque LSH tiene capacidad de hidrolizar monoacilglicéridos in vitro, la acción de la enzima MGL es esencial para el desarrollo completo de esta reacción in vivo. LSH es una enzima clave en la regulación de la principal fuente energética del organismo, los lípidos. Así, además de participar en el proceso de lipolisis es capaz de hidrolizar ésteres de colesterol en tejidos de alta capacidad esteroidogénica y otras especies lipídicas en el tejido adiposo. Teniendo en cuenta su amplio espectro funcional, esta enzima se expresa, aunque en bajos niveles, en diversos tejidos y tipos celulares como macrófagos, células β -pancreáticas, músculo esquelético y cardíaco. Además, LSH se expresa a nivel hepático tanto en células del parénquima como en las células de Kupffer, contribuyendo de esta manera a la actividad hidrolasa de ésteres de colesterol de este tejido (388,391) .

El SNS juega un papel clave en la regulación de la lipolisis modulando la actividad de LSH, tanto en el TAM como en el TAB. De los tres subtipos de receptores β -adrenérgicos, el β_3 , es el más abundante en adipocitos maduros de roedores (261), mientras que el β_1 se encuentra predominantemente en preadipocitos y el β_2 se expresa preferentemente en el sistema cardiovascular (280,304). Como ya se describió en

apartados anteriores, la acción de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) sobre los receptores β_3 -adrenérgicos induce la activación de proteínas Gs, que activan la adenilato ciclasa y consecuentemente la formación de AMPc. Un incremento en los niveles intracelulares de AMPc induce la activación de PKA que fosforila y activa a la enzima LSH (392). Contrariamente, la lipólisis es inhibida por las catecolaminas cuando se unen a receptores α_2 -adrenérgicos. La activación de los receptores α_2 -adrenérgicos estimula las proteínas Gi, inhibiendo a la adenilato ciclasa lo que disminuye los niveles de AMPc intracelular, produciéndose en último término la inhibición de LSH (393). Las catecolaminas tienen, por tanto, un efecto dual sobre la hidrólisis de triglicéridos y, por ello, su efecto lipolítico absoluto depende del balance entre la expresión de receptores α y β adrenérgicos presentes en la membrana de los adipocitos (393). En este contexto, el estudio del ratón deficiente en el receptor β_3 demostró que, aunque este receptor es el principal mediador de los efectos del SNS sobre la lipólisis en el TAB y el inicio del proceso termogénico en el TAM, en su ausencia otros receptores adrenérgicos como por ejemplo el receptor β_1 o el α_1 podrían responder a la acción de las catecolaminas probablemente mediante mecanismos compensatorios (394,395). Además de las catecolaminas, diversas hormonas como GH, glucagón, ACTH, y corticosteroides promueven la activación de LSH en adipocitos a través de la estimulación de la PKA (388). Por el contrario, otros factores como la insulina y las prostaglandinas, ejercen el efecto opuesto reduciendo la potencia enzimática de LSH. Sin embargo, PKA no es la única quinasa responsable de la regulación de la actividad de esta enzima habiéndose descrito la fosforilación de LSH por ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), la glucogenosintasa quinasa-4 (396), la quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II (397) y AMPK (388,398).

Una vez fosforilada LSH es transportada desde el citoplasma a la superficie de las gotas lipídicas donde una proteína denominada perilipina-A, tras su activación por PKA, favorece el inicio de la hidrólisis de triglicéridos a diacilglicéridos por acción de ATGL. Finalmente, la acción secuencial de LSH y MGL completa el proceso lipolítico dando lugar a la liberación de ácidos grasos libres y glicerol por los adipocitos (Fig.11).

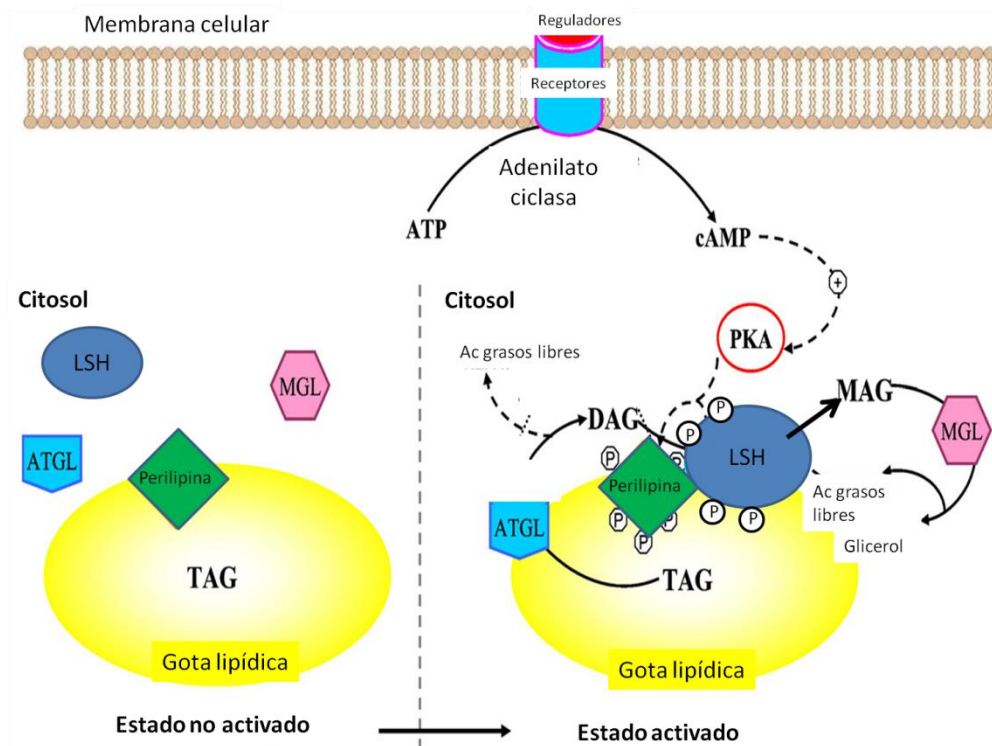


Figura 11. Modelo de lipólisis de los triglicéridos. Modificado de Lampidonis A.D, 2011, Gene 477;1–11

4.2.2.3. β -oxidación de ácidos grasos

Los ácidos grasos liberados de los adipocitos, son transportados por el torrente sanguíneo unidos a la albúmina hacia diversos tejidos, para su posterior utilización como sustratos energéticos. Una vez en el citoplasma de las células, los ácidos grasos son acilados por la acil-CoA sintasa (tiocinasa) y pasan al interior de la matriz mitocondrial donde tiene lugar su oxidación. Este proceso de transporte es mediado por una familia de proteínas transportadoras mitocondriales, denominadas carnitin palmitoil transferasas (CPT), dentro de la cual se han identificado dos tipos que varían en su sensibilidad a la regulación por malonil-CoA y su localización en la membrana mitocondrial (399)

La carnitin palmitoil transferasa 1 (CPT-1) es una enzima transmembrana localizada en la membrana mitocondrial externa, que cataliza la transferencia de un grupo acilo del acil-CoA a una molécula de carnitina dando lugar a acil-carnitina, que es transportada de esta manera al espacio intermembrana. La acil-carnitina atraviesa entonces la membrana mitocondrial interna gracias a la acción de una acilcarnitina translocasa

específica. Una vez en el interior de la mitocondria, la transesterificación es revertida por una carnitin palmitoil transferasa diferente denominada CPT-2, que está anclada en la cara de la membrana interna adyacente a la matriz mitocondrial. Esta enzima transfiere el grupo acilo a una molécula de CoA para volver a formar LCFA-CoA dentro de la mitocondria, mientras que la carnitina resultante regresa al citosol (399). A continuación el proceso de β -oxidación implica una serie de cuatro reacciones que resultan en la escisión por oxidación de dos átomos de carbono de la cadena del LCFA-CoA para obtener una molécula de acetil-CoA. Estas cuatro fases de la oxidación se repiten de manera secuencial hasta que el ácido graso se ha transformado completamente en acetil-CoA (Fig.12).

La regulación del flujo de ácidos grasos a través del sistema CPT tiene lugar a nivel de CPT-1. La actividad de esta enzima es modulada por los niveles de malonil-CoA, que como mencionamos anteriormente es el producto de la acción de la enzima ACC y el primer metabolito de la vía de síntesis de novo de ácidos grasos (400). De esta manera a nivel hepático en periodos en los que la ratio insulina/glucagón es elevada, activándose en consecuencia la síntesis de ácidos grasos se produce una elevación de los niveles de malonil-CoA que resultan en la inhibición de la actividad de CPT-1 y por tanto en el bloqueo de la β -oxidación. Por el contrario, en situaciones de restricción calórica la disminución de los niveles de malonil-CoA revierte la inhibición de CPT-1, permitiendo la oxidación de ácidos grasos en diversos tejidos junto con la síntesis de cuerpos cetónicos a nivel hepático (399). Múltiples evidencias experimentales indican que una actividad alterada de esta enzima contribuye al desarrollo de obesidad en humanos y en roedores. En pacientes obesos se ha observado una inhibición de la oxidación de ácidos grasos mediada por CPT-1 a nivel muscular (401) y el tratamiento con el inhibidor de CPT-1 Etomoxir, provoca un aumento del contenido de grasa corporal y del depósito muscular de triglicéridos, junto con una disminución de la sensibilidad a la insulina en roedores (402).

En mamíferos se han identificado tres isoformas de CPT-1 que son codificadas por genes independientes, CPT-1A, CPT-1B, CPT-1C (403). La variante CPT-1A, también conocida como CPT-1L o CPT-1 α , es la isoforma predominante en hígado, páncreas, intestino, ovario y bazo. CPT-1B (CPT-1L o CPT-1 β) es la isoforma mayoritaria en músculo esquelético y cardíaco, testículo y tejido adiposo (403). En lo que respecta a este último, el patrón de expresión de CPT1-A y -B difiere entre especies. Así, se ha descrito que CPT-1A es la isoforma mayoritaria en tejido adiposo blanco murino,

mientras que CPT-1B predomina en adipocitos humanos y de rata. Además, se ha descrito la expresión de una tercera variante CPT-1C en numerosas regiones del cerebro, donde también se ha detectado la presencia de CPT-1A (404).

Por último, mientras la ablación en el ratón de las variantes A y B es inviable, ya desde las primeras etapas del desarrollo fetal (405,406), los ratones deficientes en CPT-1C muestran un crecimiento normal, siendo en la etapa adulta resistentes a la acción de la insulina y más susceptibles que sus controles de genotipo salvaje al desarrollo de obesidad inducida por la dieta (407)

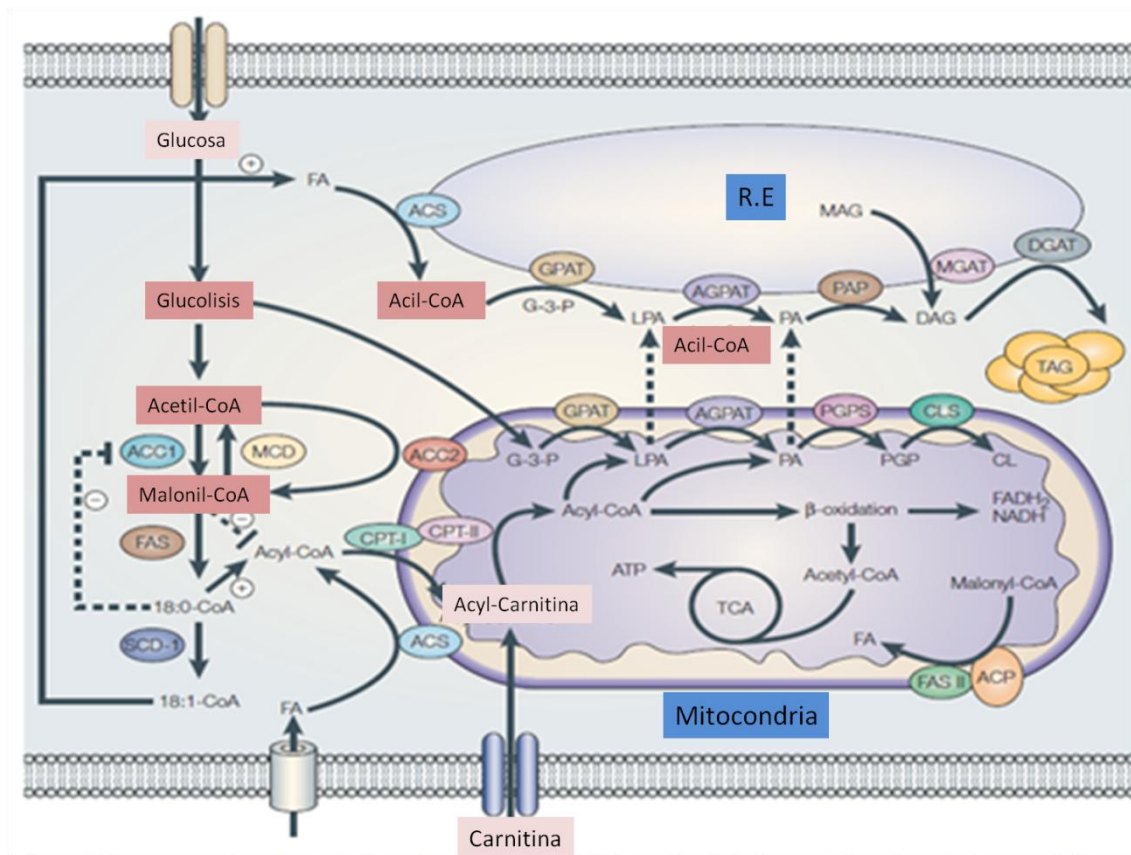


Figura 12. Resumen de la síntesis y oxidación de ácidos grasos. Modificado de BurnP, 2004 Nature Reviews

5. GESTACIÓN Y LACTANCIA COMO MODELOS FISIOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

A lo largo de las últimas décadas el estudio de distintos modelos animales ha supuesto una contribución fundamental para el desarrollo de nuestra comprensión de los parámetros que regulan los componentes del balance energético. Estos modelos experimentales resultan a grandes rasgos de la aplicación de tres grandes tipos de estrategias metodológicas: manipulaciones genéticas, modelos de cría selectiva, y estudios del impacto de modificaciones ambientales sobre el balance energético. En el primer grupo se incluiría el análisis de la influencia sobre el metabolismo energético de mutaciones genéticas aisladas, generadas ya sea de forma espontánea o bien mediante la manipulación selectiva de un gen determinado cuya transcripción es estimulada o bloqueada. Tales alteraciones genéticas son mantenidas bien de forma generalizada, afectando al conjunto del organismo a lo largo de la totalidad de su ciclo vital (manipulaciones transgénicas globales), o restringidas tanto en su duración como en su contexto en determinados tejidos o tipos celulares (modelos transgénicos inducibles y tejido específicos) (408). Sin embargo, es obvio que en la mayoría de las circunstancias las alteraciones en el balance energético que desembocan en el desarrollo de obesidad, son fruto de la acción combinada de múltiples genes e interacciones ambientales. Por ejemplo en humanos, las mutaciones monogénicas son de limitada importancia cuando consideramos el aumento de la epidemia de la obesidad, siendo sólo aplicables a pocos casos en la población obesa (409). A la vista de estas evidencias, diversos estudios se han centrado en localizar la base poligénica de la obesidad, dado que muchos de los rasgos relacionados con esta patología son altamente hereditarios y por lo tanto la selección de genotipos extremos dentro de una línea lleva a características divergentes. Así, los rasgos relacionados con la obesidad que han sido seleccionados de forma divergente a lo largo de muchas generaciones incluyen, entre otros, la masa corporal, composición corporal, nivel de ingesta, actividad espontánea o capacidad termogénica (410-412)

El último gran grupo de aproximaciones experimentales incluiría intervenciones ambientales. Los estudios en este contexto incluyen el análisis de las respuestas metabólicas de los animales a dietas altas en grasas o altas en grasas y en azúcares (dieta de cafetería) (413), investigaciones sobre los efectos de la restricción dietética en la masa corporal y la pérdida de peso (414,415) y por último, estudios sobre el impacto de

fármacos potenciales sobre algunos componentes del equilibrio energético dado que en algunos casos se requiere la intervención ambiental para revelar la propensión o resistencia a la obesidad en líneas seleccionadas o cepas endogámicas (416,417)

Tal y como se ha discutido en apartados previos de esta introducción, la supervivencia del individuo implica una serie de reacciones químicas y procesos fisiológicos en los cuales los alimentos ingeridos son transformados en la energía necesaria para el mantenimiento de los tejidos y el desarrollo de las distintas actividades vitales. Los nutrientes resultantes de la digestión de estos alimentos son absorbidos y utilizados por los distintos tejidos del organismo y, dependiendo del balance entre su utilización y depósito, participan a su vez, a través de múltiples mecanismos, en la regulación de la ingesta y el gasto energético. Por tanto, la modulación del metabolismo basal en función de cambios en las condiciones ambientales (cambios en la dieta, sedentarismo, etc.) es esencial para el mantenimiento de la homeostasis energética y el equilibrio del peso corporal. Sin embargo, la utilización de sustratos metabólicos en los distintos tejidos implica, además, otro tipo de regulación conocido como “homeorresis”, que se puede definir como el conjunto de cambios coordinados en la actividad metabólica de los tejidos destinados a asegurar la prioridad de un proceso fisiológico sin que se vean comprometidas el resto de las funciones corporales. Ejemplos clásicos de estas adaptaciones homeorréticas son el ejercicio físico, el crecimiento y estados asociados a la función reproductiva como la gestación y la lactancia. En estas situaciones el sistema nervioso central coordina estas adaptaciones metabólicas mediante señales de naturaleza nerviosa y endocrina, cuya acción sincronizada en múltiples órganos y sistemas asegura el éxito de dicho proceso fisiológico manteniendo el resto de las funciones vitales (418). La comprensión de las señales implicadas en estos procesos permitirá, por tanto, conocer los límites de nuestros sistemas reguladores y establecer las bases fisiopatológicas implicadas en el desarrollo de la obesidad y de otras patologías en las que se sobrepasan los límites de actuación de los mecanismos implicados en la homeostasis energética.

5.1 Gestación

La gestación es un estado fisiológico caracterizado por un marcado incremento de las demandas energéticas maternas dirigido a garantizar un continuo aporte de sustratos al feto, al tiempo que se mantiene una adecuada homeostasis metabólica en la madre y se asegura su preparación para la lactancia (419). Entre las numerosas adaptaciones en las

funciones fisiológicas maternas figuran, por ejemplo, cambios en la función respiratoria, cardiovascular e inmune, modificaciones conductuales, además de profundas alteraciones en los mecanismos neuroendocrinos que gobiernan el metabolismo energético. Así, durante la gestación se produce un marcado aumento de la ingesta junto con una mayor absorción intestinal de nutrientes, que permiten un aumento de la disponibilidad de sustratos energéticos destinados tanto a sostener el crecimiento fetal, como a incrementar el tamaño de las reservas grasas maternas necesarias para hacer frente a las futuras demandas energéticas durante la segunda mitad de la gestación y la lactancia (420). La evolución temporal de la tasa de ingesta durante la gestación ha sido evaluada, además de en humanos, en diferentes especies de roedores. En la rata, por ejemplo, comienza a observarse un aumento significativo de la misma durante la primera semana de gestación (421,422), que se hace más marcado a medida que ésta progresa, alcanzando una elevación de entre un 50 a un 60% por encima de los valores de los animales no gestantes en los días previos al parto (18-19 días post coitum). Un perfil similar se ha observado en distintas cepas de ratones, aunque el incremento en la ingesta no es evidente hasta la segunda semana de gestación (9-11 días post coitum) (423,424). En humanos, aunque la cantidad de comida ingerida depende de múltiples factores como la disponibilidad y la densidad energética de los alimentos, factores sociales etc., se ha descrito un aumento de la ingesta durante los dos últimos trimestres de la gestación de aproximadamente un 19% (425). Sin embargo, y teniendo en cuenta todos estos datos es importante destacar que el incremento de la tasa de ingesta se produce de forma previa al aumento de las demandas metabólicas del feto. De esta manera, estos cambios en el patrón de ingesta contribuyen de manera significativa al desarrollo de un balance energético positivo, que resulta en un aumento de las reservas grasas maternas. Así, diversos estudios de composición corporal realizados tanto en roedores como en humanos, demostraron que al aumento de peso corporal observado durante la gestación, no contribuyen únicamente el feto y la placenta, sino que éste también es debido al aumento del tamaño de ciertas estructuras maternas, como por ejemplo el hígado y los depósitos grasos, que constituyen el factor cuantitativamente más importante (426). Dado que el desarrollo fetal depende directamente de los nutrientes que atraviesan la placenta, la madre debe adaptar su metabolismo para poder hacer frente al continuo trasvase de sustratos hacia el feto. La placenta es un órgano temporal esencial en este proceso. Mientras en humanos la estructura definitiva de la placenta es evidente ya a los 21 días de gestación, en ratones la formación de las tres

capas de la placenta madura (laberinto, espongiotrofoblasto y decidua) no se completa hasta la segunda semana de gestación (14.5 d.p.c.) (427,428).

Además de su papel como interfaz de comunicación entre la madre el feto, la placenta sintetiza hormonas que alteran la fisiología materna asegurando el éxito de la gestación y el correcto desarrollo fetal, además de constituir una barrera de protección del feto frente al sistema inmune materno. La función endocrina placentaria es substancialmente diferente entre humanos y roedores. La progesterona es esencial para el mantenimiento del embarazo al promover la quiescencia uterina. Así, mientras en ratones la producción de progesterona depende del cuerpo lúteo gestacional; en humanos éste es sustituido por la placenta, tras su desarrollo, en la producción de este esteroide. En ratones, tras el cruce, la producción hipofisaria de prolactina se incrementa produciéndose una secreción pulsátil de la misma, que mantiene la síntesis de progesterona por el cuerpo lúteo durante la primera semana de gestación (hasta el día 8-9 p.c.) (427). A partir de ese momento la producción secuencial por la placenta de lactógeno placentario I y II sustituye a la prolactina en su acción luteotrófica. No es hasta el final de la gestación, cuando un cambio en la proporción de estradiol y progesterona circulantes, como consecuencia de un aumento de la secreción de estradiol y una disminución de la secreción de progesterona, provoca la reaparición de la pulsatilidad de prolactina previa al parto (420),(Fig.13).

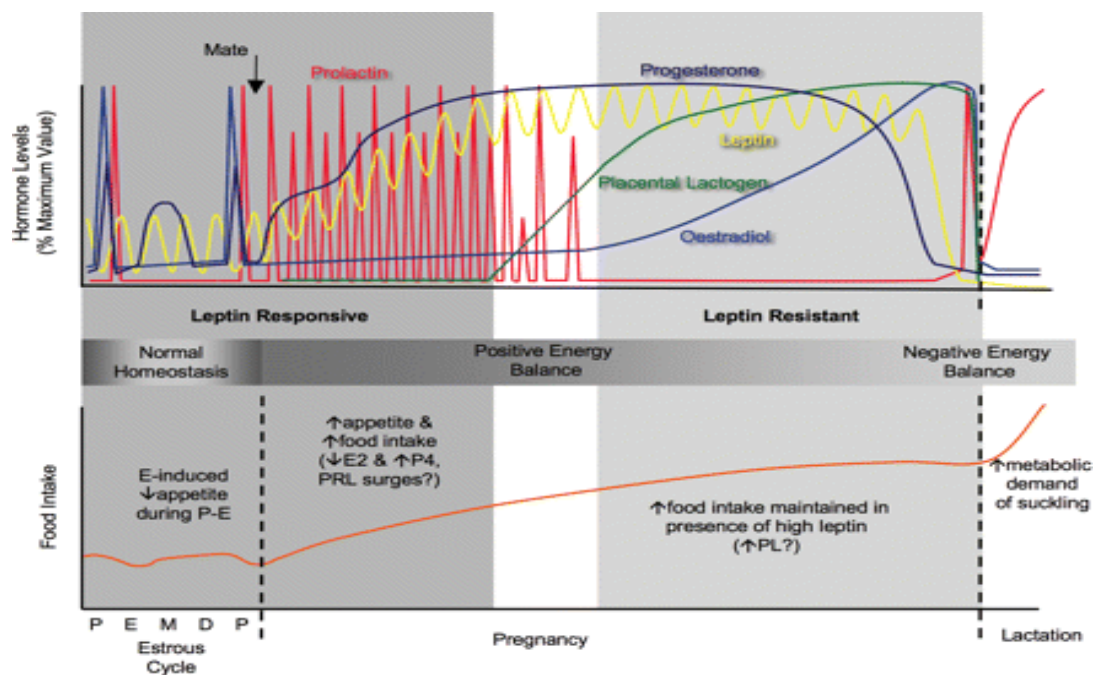


Figura 13. Esquema representativo de los cambios hormonales y de la ingesta durante el ciclo estral de la rata, la gestación y la lactancia. Tomada de Augustine R.A. 2008, *Journal of Physiology* 15; 586(2):387-97

La placenta es esencial para el desarrollo fetal dado que es la única fuente de nutrición, intercambio de gases y eliminación de desechos disponible para el feto. La importancia de las necesidades fetales de los metabolitos maternos puede ser inferida a partir del estudio cualitativo y cuantitativo del transporte placentario(426). En este sentido la glucosa es el principal sustrato energético suministrado a través de la placenta al feto. Su transporte ocurre por difusión facilitada, es independiente de insulina y está mediado por los transportadores de hexosas GLUT-3 y GLUT-1 (429). A pesar de que el feto recibe grandes cantidades de glucosa, una proporción significativa de la misma es oxidada a lactato a nivel placentario, para ser utilizada como fuente de energía por el feto. La relevancia del transporte placentario de glucosa se pone de manifiesto, al menos en la rata, por la incapacidad del feto para sintetizarla a partir de otros sustratos transferidos por la placenta. El transporte de aminoácidos, cuantitativamente muy inferior al de la glucosa, ocurre por transporte activo e implica una cierta actividad metabólica de la placenta. Por último a pesar de que durante la gestación, como se verá más adelante, existe una elevación de los niveles de lípidos circulantes, el transporte placentario de ácidos grasos, al menos en la rata, es muy bajo.

Durante los dos primeros tercios de la gestación en roedores y, coincidiendo con un mínimo crecimiento del feto, se produce un aumento de la acumulación de reservas grasas en la madre. Esta condición anabólica, está asociada no sólo al incremento de la ingesta sino también al aumento de la sensibilidad, producción y secreción de insulina (430,431). A esto, se suma la disminución de la expresión y actividad de los receptores β -3 adrenérgicos en el tejido adiposo, la disminución de la respuesta a catecolaminas (430) y la consiguiente inhibición de la movilización de lípidos. El progresivo incremento de la sensibilidad a la insulina, junto con un aumento de los niveles circulantes de progesterona y cortisol promueve la lipogénesis en el TAB como consecuencia de la estimulación de la actividad de LPL (432-434). Los cambios en el metabolismo lipídico durante esta etapa se acompañan de cambios morfológicos y funcionales en los adipocitos, que sufren un proceso de hipertrofia e incrementan la producción de distintas adipoquinas, entre las que se encuentran leptina, adiponectina y resistina, (83,435) y ciertas citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF α que a su vez contribuirán a las adaptaciones del metabolismo energético en este estado (436-438). De todas ellas quizás ha sido leptina la que ha recibido más atención durante los últimos años, dado que paradójicamente en la gestación co-existen la presencia de

hiperfagia e hiperleptinemia. Al aumento de los niveles circulantes de leptina contribuyen, no solamente el incremento de su producción por el tejido adiposo sino también por la placenta (439-441), aunque en algunas especies como en el ratón la existencia de una significativa producción placentaria de leptina es discutida (442,443). A pesar de que la leptina es una hormona que actúa como señal de saciedad reduciendo la ingesta, durante la gestación co-existen un incremento de la concentración de leptina plasmática, y un aumento de la ingesta, y del tamaño de los depósitos grasos, que sugiere la existencia de un estado fisiológico de resistencia a la leptina similar al desarrollado en la obesidad (421,440). Diversos mecanismos periféricos y centrales contribuyen al desarrollo de este estado de resistencia a la leptina (422,436,440,444). Como ya se mencionó en el apartado 2.2.1. de esta introducción la unión de leptina a la forma larga del receptor ObRb es esencial para mediar el efecto de esta hormona sobre la regulación del balance energético y del peso corporal. Además de esta isoforma se han descrito otras cinco variantes cortas fruto del procesamiento alternativo del gen *obr* (ObRa-ObRf), a las que se han adjudicado distintas funciones como por ejemplo: el antagonismo de la acción de la leptina, el transporte a través de la barrera hematoencefálica, y su actuación como proteínas circulantes de unión a ligando.

Así en el ratón, y en menor medida en la rata, durante la gestación se produce un aumento de la concentración plasmática de la forma soluble del receptor (OB-Re), producida y secretada por la placenta. Asumiendo que la fracción de leptina unida a esta proteína soluble es inactiva desde el punto de vista de señalización, los altos niveles observados de Ob-Re podrían contribuir al bloqueo de las acciones fisiológicas de esta hormona (445,446). La contribución de este mecanismo en el ratón parece ser crucial en el desarrollo de un incremento de la ingesta durante la gestación, a pesar de la presencia de elevados niveles de leptina circulante, puesto que se ha descrito que la administración i.c.v. de esta hormona es capaz de inhibir la ingesta en ratones gestantes y lactantes de manera similar a sus controles vírgenes (423).

A nivel central, dos son los mecanismos implicados en la disminución de la acción anorética de la leptina en este estado. La mayoría de los estudios realizados a este respecto utilizan como modelo experimental la rata, puesto que como ya se ha discutido anteriormente la gestación murina parece caracterizarse por una resistencia a la leptina más bien de origen periférico que central. En primer lugar una reducción del transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica, evidente ya a los 13 días de gestación

(422), a la que contribuiría la disminución de la expresión en los plexos coroideos de la forma corta del receptor Ob-Ra implicada en el transporte de leptina hacia el tejido cerebral (444). En segundo lugar y a medida que progresa la gestación además de una disminución de la disponibilidad de leptina a nivel central, se produce una inhibición de la señalización de esta hormona en los principales núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la homeostasis energética (421,422,436,440,444,447,448).

Las vías de señalización intracelular y los circuitos neuronales activados por leptina han sido objeto de extenso estudio a lo largo de las últimas décadas (449,450). La leptina, mediante su unión a la isoforma larga del receptor ObRb a nivel hipotalámico, da lugar a la activación mediante autofosforilación de la tirosina quinasa citoplasmática JAK2 iniciándose, de esta manera, una serie de eventos intracelulares que incluyen: 1) el reclutamiento y activación de las proteínas STAT (STAT-3, de mayor relevancia a nivel hipotalámico, 5 y 6), que dimerizan y translocan al núcleo donde activan la transcripción de distintos genes; 2) la estimulación de PI3K, posiblemente a través del sustrato del receptor de insulina-2 (IRS-2), que resulta en la fosforilación de la proteínquinasa B (PKB) también conocida como AKT y 3) la activación de la vía de RAS/MAPK (común también con insulina), actuando en último término sobre las quinasas reguladas por señales extracelulares- 1 y 2 (ERK-1/2). La vía de JAK-STAT-3 fue el primer mecanismo de señalización relacionado con el receptor de leptina (451). Esta cascada de señalización es un mediador esencial en las acciones de leptina sobre el balance energético, como se infiere del hecho de que en ratones tanto la inactivación central de STAT-3, como la eliminación selectiva de la tirosina Tyr 1138 en el gen que codifica Ob-Rb (ratones s/s) se traduce en el desarrollo de obesidad e hiperfagia junto con una reducción del gasto energético; aunque la delección total de STAT-3 lleva asociadas además múltiples alteraciones neuroendocrinas como un menor crecimiento lineal, infertilidad, diabetes e hipercortisolismo (452,453). Curiosamente aunque la deficiencia total de STAT-3 a nivel central causa un aumento de la expresión de NPY/AgRP y una disminución de los niveles de ARNm de POMC, los ratones s/s muestran alteraciones similares únicamente en la expresión de POMC y AgRP. Por tanto, estos datos sugieren que la activación de STAT-3 en respuesta a leptina tiene como resultado la estimulación transcripcional de POMC y la inhibición de la expresión de AgRP, mientras que la regulación por leptina de la transcripción de NPY parece estar relacionada con otras vías independientes de STAT-3 (453). Una posible alternativa

sería la vía de PI3K/AKT cuya activación en respuesta a leptina altera la actividad eléctrica de las neuronas AgRP/NPY hiperpolarizándolas, además de inactivar al factor de transcripción FOXO1 (*Forkhead box protein O1*) que incrementa la expresión de NPY y AgRP al unirse al promotor del gen que codifica para ambos neuropéptidos (449).

En este contexto, dos reguladores negativos de la vía JAK-STAT se han implicado en la génesis de la resistencia a la leptina a nivel central (454) : 1) SOCS3, cuya expresión es inducida por STAT3, y a su vez bloquea la fosforilación de las proteínas JAK y la activación de las proteínas STAT (455,456) y 2) la tirosin fosfatasa 1B (PTP1B), que además de desfosforilar a JAK2 bloqueando la señalización de leptina, atenúa la acción de la insulina al desactivar igualmente al receptor de insulina (457,458).

Distintas evidencias experimentales sugieren que bajo la influencia de las alteraciones hormonales en la madre gestante (cambios en el perfil de secreción de prolactina, inhibición de la secreción cíclica de estradiol, incremento de la producción de progesterona por el cuerpo lúteo e inicio de la producción de lactógeno placentario por la placenta en desarrollo) varios de estos mecanismos dan lugar al inicio de una resistencia central a la leptina entorno a la mitad de la gestación. Por un lado, aunque se ha descrito que la expresión de OB-Rb a nivel del NVM hipotalámico disminuye ya a los 7 días p.c. y se mantiene reducida a lo largo de la gestación (444), no es hasta los días previos al parto (18 d.p.c.) cuando los niveles de ARNm de esta isoforma, así como su expresión proteica se ven reducidos en la totalidad del hipotálamo (422,440). Sin embargo, existen evidencias funcionales que indican la presencia de una alteración de la señalización de leptina a nivel central ya a los 13 días de gestación, puesto que su administración i.c.v. en ratas gestantes es incapaz de reducir la ingesta a partir de esta etapa (421,422). A esta situación contribuyen el aumento de la producción de SOCS-3, los reducidos niveles proteicos de STAT-3, presentes en el NVM, y la inhibición de su fosforilación a nivel hipotalámico en respuesta a la administración i.c.v. de leptina, afectando en concreto, a los núcleos NVM y ARC (421,422). Trujillo y cols. han demostrado recientemente que en la etapa final de la gestación y, coincidiendo con los valores máximos tanto de ingesta como de leptina circulante, se produce además un bloqueo de la activación por leptina de la vía PI3K/ AKT (422). A estas alteraciones de la vía de señalización de leptina podrían contribuir, como ya se ha mencionado previamente, distintos factores hormonales de origen materno o placentario. Un modelo

bien establecido para diferenciar los efectos causados por las hormonas de origen materno y las producidas por la placenta es la pseudogestación en ratas. En este modelo en el que se observa una hiperfagia en ausencia de resistencia a la leptina, se ha demostrado que el lactógeno placentario juega un papel fundamental en la inhibición de la señalización de leptina durante la gestación. Augustine y cols.(420) demostraron que la administración de prolactina en ratas pseudogestantes provocaba la desaparición de la disminución de la ingesta inducida por leptina. Posteriormente el mismo grupo de investigación demostró que la hiperprolactinemia característica del final de la gestación (20-21 d.p.c.) está asociada a un incremento en los niveles hipotalámicos de ARNm de SOCS-1 y -3, que podía ser revertida tras el tratamiento con bromocriptina, agonista dopaminérgico que bloquea la secreción de prolactina (459).

Por último todas estas alteraciones en la señalización de leptina durante la gestación se traducen, en último término, en cambios en el perfil de expresión de distintos neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación del balance energético. Múltiples estudios utilizando distintas metodologías experimentales (hibridación in situ, RT-PCR, PCR en tiempo real) han evaluado la modulación de la producción de neuropéptidos como NPY/AgRP y POMC durante la gestación, con desiguales resultados (422,436,448,460,461). Un ejemplo de esta controversia es el caso de POMC. Inicialmente Mann y cols., utilizando como aproximación metodológica la hibridación in situ no radiactiva, mostraron que al final de la gestación en la rata se producía una reducción del número de neuronas POMC positivas en el ARC, aunque el análisis de la intensidad de la señal en las mismas reveló un incremento en la expresión de POMC en este núcleo a lo largo de todas las fases de la gestación (461). Posteriormente, el grupo de Rocha y cols. demostró, utilizando como técnica experimental RT-PCR semicuantitativa, que los niveles de ARNm de POMC no variaban en ratas gestantes a lo largo del mismo periodo, así como tampoco los niveles de los receptores MC-4, mientras que observaron un incremento en la expresión de AgRP, el antagonista endógeno de MC4R postulando a AgRP como posible responsable de la hiperfagia durante la gestación (448). Por último, y más recientemente, mientras Caminos y cols., mediante PCR en tiempo real, demostraban un incremento progresivo de la expresión hipotalámica de POMC desde el día 16 de gestación hasta el término de la misma (460); Trujillo cols. utilizando hibridación in situ radiactiva observaron una disminución de su producción en el último tercio de la gestación (422). Similares resultados contradictorios se han publicado respecto a la expresión de NPY a nivel del

núcleo ARC hipotalámico, con algunos autores defendiendo un incremento de los niveles de ARNm del mismo (422,436), no observado por otros grupos (448,462).

A pesar de que se ha considerado que la resistencia a la leptina durante la gestación en el ratón no implica cambios en la señalización de esta hormona a nivel central, varios estudios han demostrado modificaciones en la expresión de los neuropéptidos ya mencionados en esta especie. Así, Oberto y cols. demostraron que durante la última fase de la gestación en ratones, mientras se producía un aumento de la producción de NPY en el núcleo VM esta disminuía o no se modificaba en los núcleos PV y ARC, respectivamente (463). Por último, Makarova y cols. (464) observaron que mientras la expresión hipotalámica de NPY incrementaba progresivamente a lo largo de la gestación, los niveles de ARNm de AgRP aumentaban únicamente a los 18 días p.c.

A nivel del AHL se expresan entre otros los neuropéptidos orexina-A y -B, y MCH (véase apartado 3.1.2 de esta introducción), que además de sus efectos moduladores de la ingesta participan en la regulación del gasto energético (465), la actividad locomotora (465), los ciclos sueño-vigilia (466) y la función reproductiva (467). Aunque resultados de nuestro grupo demostraron que en la gestación a término en la rata se producía una disminución de los niveles de expresión hipotalámica de prepro-orexina (436), diversos autores han mostrado con posterioridad un aumento (468) o una no modificación de los niveles de este precursor (448), además de una disminución de los niveles de expresión de orexina A y un aumento de sus niveles plasmáticos (469). Por otro lado MCH deriva junto con el neuropéptido EI (NEI) de un mismo precursor común prepro-MCH, que se expresa predominantemente en el AHL y la zona incerta (ZI) (470). Datos tanto de nuestro grupo como de otros autores revelan una disminución o una no modificación de la expresión de este precursor en el último trimestre de la gestación (436,448,470).

La gestación a término es un modelo clásico de inhibición de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la respuesta al estrés (471), viéndose afectada la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) a distintos niveles incluyendo: 1) la reducción de la expresión de CRH en el NPV del hipotálamo, 2) la alteración de los niveles basales, el ritmo de secreción circadiano y la secreción en respuesta al estrés de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y 3) la disminución de la fracción libre de glucocorticoides circulantes. Como ya se mencionó en el apartado 3.1.3.1 de esta introducción CRH además de sus acciones endocrinas, ejerce parte de sus efectos como mediador de la respuesta al estrés, disminuyendo la ingesta y aumentando la actividad locomotora y el gasto energético. Por tanto la reducción de su

expresión al final de la gestación contribuiría en parte al incremento de la ingesta observado en este estado. Finalmente, otro neuropéptido expresado a nivel del NPV hipotalámico con acciones moduladoras tanto de la ingesta como del gasto energético es TRH, cuyos máximos niveles de expresión en el ciclo reproductivo se observan al final de la gestación y en el primer día de la lactancia (472).

Además de las adaptaciones ya descritas en los mecanismos centrales que regulan la ingesta durante la última etapa de la gestación y coincidiendo con el momento de máximo crecimiento fetal, el incremento de las necesidades de sustratos energéticos para el mismo provoca profundas alteraciones en el metabolismo materno. De esta manera, durante el último tercio de la gestación, el tejido adiposo materno cambia a un estado principalmente catabólico, favorecido por el desarrollo de una resistencia periférica a la insulina (473), como consecuencia de la estimulación de la actividad de LSH, (474). Sin embargo, la sensibilidad a la insulina se encuentra elevada en la placenta y en el feto, contribuyendo al drenaje de nutrientes al mismo (475).

Además, favoreciendo la movilización lipídica del TAB, tiene lugar la inhibición de la captación de ácidos grasos libres en el tejido adiposo (476), combinada con una menor oxidación y una mayor síntesis de novo de ácidos grasos en el hígado, que tiene como resultado el aumento de la síntesis hepática de triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad VLDL, característico de la última fase de la gestación (477-479).

En conjunto, este patrón lipídico es similar, en cierta medida, al descrito en respuesta a procesos inflamatorios, por lo que la gestación, al igual que la obesidad, es considerada como un estado de inflamación sistémica subclínica asociado a un incremento en los niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6, IL-1 o $\text{TNF}\alpha$, y marcadores de inflamación como la proteína C-reactiva (83) (Fig.14)

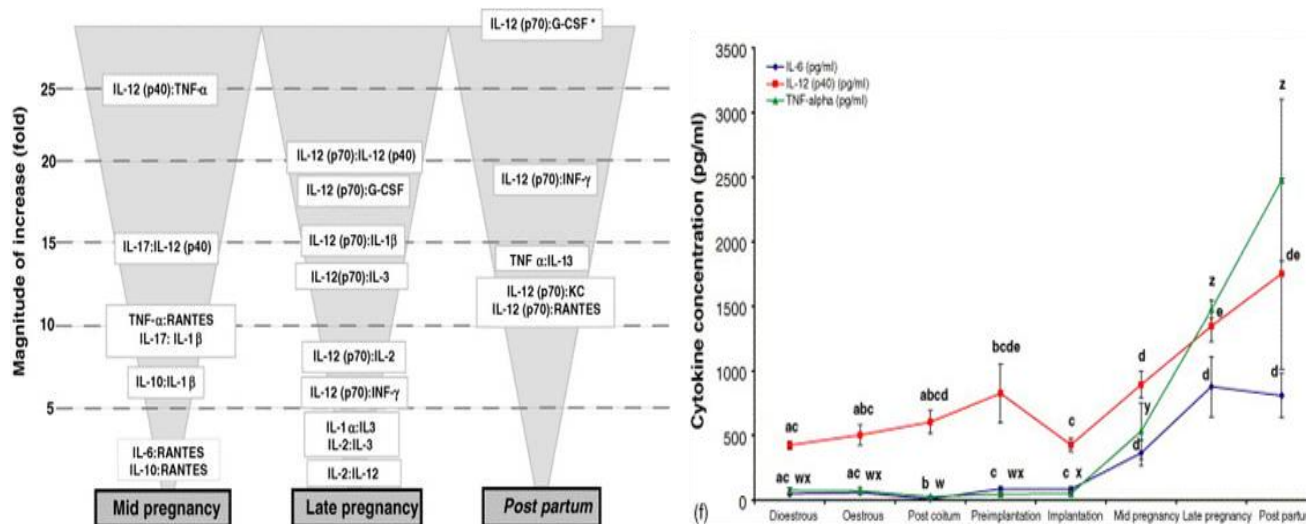


Figura 14. Aumento de los niveles circulantes de interleuquinas pro-inflamatorias en la última fase de la gestación. Tomada de Orsi , 2006, Anim. Reprod Sci.

Aunque existen múltiples datos en la bibliografía acerca de la participación de estas citoquinas en el desarrollo de patologías como la obesidad y diabetes (81,480) hasta la fecha pocos estudios han abordado el papel de estos factores en la modulación del metabolismo, homeostasis energética y la adiposidad en situaciones no patológicas como la gestación. En este contexto, IL-6 objeto de estudio en esta tesis, es quizás una de las más estudiadas (435,481-483). Así se ha descrito que, a pesar de que la producción de IL-6 por el tejido adiposo abdominal incrementa significativamente a partir de la primera semana de gestación en la rata (435), este aumento no se traduce en una mayor secreción de esta citoquina por el mismo, lo que sugiere su posible acción como regulador autocrino de la función adipocitaria en este estado. Teniendo en cuenta estos resultados y dado que los niveles circulantes de IL-6 incrementan en el último tercio de la gestación tanto en ratas como en ratones (83,435), coincidiendo con el desarrollo en ambas especies de una placenta completamente funcional, se ha sugerido que ésta podría actuar como una fuente de producción alternativa que justificase el aumento de la concentración plasmática de IL-6. De hecho, en el transcurso de una gestación normal, prácticamente todas las citoquinas conocidas están presentes y activas en la placenta y sus estructuras asociadas. Entre otras funciones, se ha descrito la intervención de estos factores en el control del proceso de implantación y la regulación del crecimiento y diferenciación del trofoblasto; además de participar en la modulación de la respuesta inmune materna, al tiempo que protegen al feto frente a procesos infecciosos (484-486). Así, se ha descrito que la placenta humana expresa y secreta IL-6 en cantidades crecientes desde el primer trimestre de la gestación (487) y, aunque

existen pocas publicaciones al respecto, se ha detectado también su presencia a nivel placentario en ratas y ratones (488,489).

Independientemente de su origen, la IL-6 circulante parece atravesar la barrera hematoencefálica al menos durante la segunda semana de gestación, puesto que los niveles de esta citoquina también se incrementan en el LCR de ratas gestantes durante este periodo, para retornar a sus valores basales en los días previos al parto (435). Estos datos sugieren que en la gestación a término podría producirse una inhibición del sistema de transporte de IL-6 al SNC similar a la ya descrita en el caso de leptina (490), evitando de esta manera sus efectos inhibitorios sobre la ingesta. Sin embargo, es necesario tener en cuenta el hecho de que IL-6 puede ser producida además a nivel encefálico tanto por astrocitos como por células nerviosas, que podrían ser los responsables de las variaciones observadas en los niveles de IL-6 en LCR durante la gestación (491,492).

Por otro lado, sea cual sea su origen, central o periférico, otra cuestión sin responder es el significado fisiológico del incremento en la concentración de IL-6 a nivel central durante las dos primeras semanas de gestación. Como ya se discutió en el apartado 2.3.4.2, la administración i.c.v de IL-6 en ratas disminuye el peso y la adiposidad corporal, inhibiendo la ingesta e incrementando el consumo de oxígeno (158). Así, se ha descrito que los efectos centrales de IL-6 sobre el gasto energético basal son mediados, al menos en parte, por su acción estimuladora de la innervación simpática del tejido adiposo marrón (170). En este contexto cabe señalar que, durante la gestación, además de las adaptaciones metabólicas y neuroendocrinas ya descritas, se producen cambios significativos en las características morfológicas del tejido adiposo marrón además de una inhibición de su capacidad termogénica, que contribuyen aún más al balance energético positivo en este estado. Concretamente, en roedores, y como consecuencia de un progresivo incremento de la acumulación lipídica, el tamaño del depósito de grasa marrón interescapular se hace cada vez mayor, mostrándose claramente hipertrofiado en la etapa final de la gestación. Paralelamente, su contenido de mitocondrias se reduce, alcanzando en la rata un 50% de los valores de animales no gestantes desde el día 11 p.c, lo que sugiere la existencia de alteraciones previas en el proceso de biogénesis mitocondrial (493). En esta franja temporal, días 11-13 p.c., se produce además una disminución de la actividad oxidativa del TAM debida a la reducción de la actividad citocromo-oxidasa (COX) que, junto con un aumento de la ratio de expresión de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ respecto a los $\beta 3$, facilita aún más el depósito de lípidos en

este tejido (493). Por último, y reflejando los cambios que tienen lugar en la capacidad termogénica del TAM durante la gestación, la expresión en el mismo de las proteínas desacopladoras UCP-1 y 3 sufre importantes modificaciones, alcanzando un máximo a los 13 días p.c. para luego disminuir durante los días previos al parto (493).

5.2 Lactancia

La lactancia, al igual que la gestación, se caracteriza por un marcado aumento de las demandas energéticas maternas, destinadas en este estado fisiológico, a sostener la producción de leche, necesaria para el desarrollo neonatal, causando intensos ajustes neuroendocrinos y metabólicos en la madre. De hecho, en mamíferos, la lactancia es quizás el período de mayor coste energético a lo largo de todo el ciclo vital (494). Así, si en la gestación a término en roedores la tasa de ingesta se elevaba aproximadamente un 60% por encima de los valores presentes en animales no gestantes; durante la lactancia la ingesta se incrementa drásticamente, llegando a duplicar e incluso triplicar los niveles previos al inicio del ciclo reproductivo (495,496). En el ratón, aunque también en la rata, este incremento de la ingesta se produce de forma lineal en el transcurso de los 10 días posteriores al parto, para luego mantenerse constante hasta el momento del destete en su valor máximo, que depende del tamaño de la camada (Fig.15).

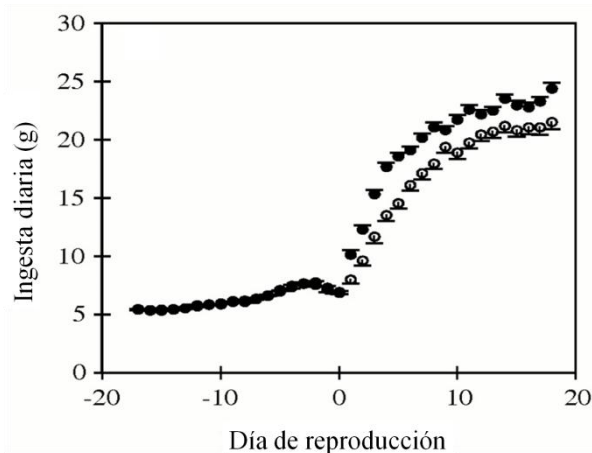


Figura 15. Ingesta diaria en ratones MF1 a lo largo de la gestación y la lactancia (círculos negros= madres con camadas naturales, 9-15 crías; círculos blancos= madres con camadas reducidas). El día 0 corresponde al parto. Tomado de Johnson, M. S. 2001, J Exp. Biol;204:1925-1935

Además de esta marcada hiperfagia, y en parte como consecuencia del aumento de carga funcional que ésta supone, los órganos del tracto digestivo materno sufren un proceso de hipertrofia que favorece en último término una mayor absorción intestinal de nutrientes, como sales, agua, glucosa y aminoácidos, a partir de la comida ingerida (495,497,498). Tras el parto la glándula mamaria adquiere prioridad metabólica sobre otros tejidos del organismo, de manera que gran parte de los nutrientes absorbidos son redirigidos hacia ésta para soportar la síntesis y secreción de leche (418). A pesar de que existen diferencias entre especies en el tipo y cantidad de sustratos utilizado por el tejido mamario para la lactogénesis, las estrategias fisiológicas empleadas en la captación y utilización de los mismos por este tejido son similares (499) e incluyen: 1) un aumento del flujo sanguíneo a la glándula mamaria; 2) una disminución de la utilización de sustratos energéticos por los tejidos periféricos y 3) un incremento de la actividad metabólica del tejido mamario. La participación del sistema endocrino en este proceso está caracterizada por cambios en los niveles circulantes de distintas hormonas, como leptina e insulina, y en la sensibilidad de los distintos tejidos maternos a las mismas.

En general los principales nutrientes necesarios en el proceso de lactogénesis son agua, glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, Ca y K (500). Sin embargo, y a pesar de la hiperfagia característica de este estado, durante la lactancia temprana se produce un balance negativo de estos nutrientes esenciales, que es cubierto por el organismo materno gracias a la movilización de sus reservas energéticas. En este contexto, el tejido adiposo, principal órgano de reserva de energía del organismo, juega un papel crucial en este periodo y desarrolla numerosas estrategias para permitir el mantenimiento de la homeostasis energética materna. Así, durante la lactancia, tiene lugar una estimulación de la lipólisis (reflejada por el aumento de la síntesis y actividad de la enzima LSH), y una menor captación y síntesis de ácidos grasos (motivada por la disminución de la expresión de las enzimas lipogénicas LPL, ACC y FAS) (501-503). Por ello, el resultado neto de estas adaptaciones en el metabolismo lipídico del tejido adiposo, es la movilización de las reservas grasas maternas, acumuladas durante la gestación. Este estado catabólico en el tejido adiposo se ve favorecido, además, por el desarrollo de resistencia a la insulina en el mismo, que tiene su origen en la gestación a término (504,505). En esta última, a pesar de los elevados niveles de insulina circulante y del incremento del número de receptores de insulina por adipocito, la tasa de incorporación de glucosa a lípidos no se ve afectada (506). Durante la lactancia temprana, sin

embargo, las concentraciones plasmáticas de insulina descienden marcadamente, sin que se observen cambios en los niveles de receptores de insulina en la membrana de las células adipocitarias, lo que se traduce en una disminución de la oxidación de glucosa y su utilización para la síntesis de ácidos grasos (429,506). En ambos casos, esta inhibición de la acción de insulina parece no estar mediada por alteraciones en el proceso de unión a su receptor o de internalización del complejo ligando-receptor y probablemente está asociada a mecanismos post receptor (506).

Además de insulina otras hormonas cuya producción se incrementa durante la lactancia, asegurando el mantenimiento de la lactogénesis, contribuyen además a la disminución de la capacidad lipogénica del tejido adiposo en este periodo (507-509,509).

El estado de balance energético negativo que se instaura en la madre al inicio de la lactancia, y la correspondiente movilización de las reservas grasas, tiene como consecuencia una disminución de la expresión en el TAB de distintas adipocitoquinas como leptina y resistina, en la rata, y adiponectina en el ratón (510-512) ; mientras en la rata incrementa la producción de otras como el factor inducible por el ayuno (FIAF) (513). Entre todas las adipoquinas mencionadas es de nuevo, leptina, al igual que ocurría en el caso de la gestación, la que ha recibido más atención en los últimos años como mediador de las adaptaciones de la homeostasis energética materna (511,514).

Así, y de acuerdo con la inhibición de su expresión a nivel del tejido adiposo, los niveles circulantes de leptina se encuentran significativamente reducidos en ratas lactantes, tanto durante la fase diurna como la nocturna del ciclo luz/oscuridad (514,515). Dado que el aumento de la concentración plasmática nocturna de esta hormona en roedores se considera como una señal de terminación del periodo de ingesta, la desaparición o atenuación de este pico nocturno durante la lactancia se ha considerado como un mecanismo que favorece la hiperfagia característica de este estado (515,516).

Además y a pesar de la hipoleptinemia característica de la lactancia (517), existen diversas evidencias en la bibliografía acerca de la existencia de alteraciones en la sensibilidad central a las acciones anoréticas de leptina en este estado. Por un lado, aunque en su estudio en ratones Mistry y cols. (423) demostraron que la administración central de leptina es capaz de reducir efectivamente la ingesta durante la lactancia, otros autores han obtenido desiguales resultados en la rata (511,516,518). Así mientras los datos del grupo de Vernon y cols. (511) indican que la administración exógena de leptina tiene un menor efecto anorético (menos del 20%) en ratas lactantes que en sus

controles vírgenes; Higuchi y cols. observaron que el bloqueo de la respuesta a la leptina administrada i.c.v era similar en ratas gestantes a término que en animales en la primera semana de lactancia (516). Por último, los resultados de un reciente estudio de Suzuki y cols. (518) indican que la administración intravenosa de esta hormona, en dosis capaces de reducir la ingesta en animales vírgenes, es incapaz de revertir la hiperfagia característica de este estado. Sin embargo, los mismos autores demostraron que este efecto no es debido a un fallo de su transporte a través de la barrera hematoencefálica puesto que, en estos experimentos, no existían diferencias entre ratas vírgenes y lactantes en los niveles de leptina en LCR, antes y después de recibir el bolo de leptina. Por tanto la lactancia, al menos en la rata, parece caracterizarse por una reducida sensibilidad a la acción de la leptina a nivel central, debida probablemente a alteraciones en la densidad de sus receptores en los distintos núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la homeostasis energética (440,446,519,520). Así, aunque el contenido hipotalámico total del ARNm y de la proteína de la forma larga del receptor (Ob-Rb) son similares en ratas vírgenes y lactantes (440,446); su producción en el núcleo VM se mantiene reducida durante la lactancia, elevándose, por el contrario, en el núcleo PV (519). Por otro lado, datos de otros autores y de nuestro grupo sugieren que contribuyendo a reducir la sensibilidad hipotalámica a la leptina, durante la lactancia se produce un incremento en la expresión hipotalámica de varias isoformas cortas de su receptor (Ob-Rc, Ob-Re y Ob-Rf), que actuarían como antagonistas funcionales de la misma (440,520).

Respecto a las posibles alteraciones a nivel hipotalámico en las vías de señalización intracelulares que median la acción de la leptina durante la lactancia, los datos recogidos en la bibliografía parecen marcar una clara división entre la primera y la segunda semana de la misma (459,521-523). Así, en el día 7 post parto se mantiene todavía una significativa inhibición de la fosforilación de STAT-3 en respuesta a la administración i.c.v. de leptina y unos elevados niveles de expresión de SOCS-1 y 3 a nivel del núcleo ARC hipotalámico (459,523). Ambos mecanismos podrían contribuir por tanto a la disminución de la sensibilidad a la leptina observada en este punto de temporal. Por el contrario en la segunda semana de lactancia la expresión de ambas proteínas (SOCS-1 y 3) se encuentra significativamente disminuida, lo que excluye su participación como mediadores en la hiperfagia característica de la lactancia (520,521).

Reflejando, no sólo el balance negativo en este estado, sino también las modificaciones observadas en la señalización de leptina a nivel central, durante la lactancia se producen marcadas alteraciones en los circuitos neuronales implicados en la regulación de la homeostasis energética. De tal manera que, la hiperfagia materna está mediada a nivel del núcleo ARC hipotalámico por un incremento de la síntesis de los neuropéptidos orexigénicos AgRP y NPY (524,525), y por la inhibición del neuropéptido anorexigénico POMC (526). Sin embargo, durante la lactancia en la rata se activa además otra población de neuronas productoras de NPY localizadas en el núcleo dorsomedial hipotalámico, que normalmente permanecen quiescentes activándose únicamente en respuesta a situaciones que implican un balance energético negativo como este estado fisiológico, el ejercicio físico o el ayuno (261,527,528), o en ciertos modelos de obesidad genética en roedores (529-532). A lo largo de los últimos años numerosas publicaciones han abordado el estudio de la regulación de ambas poblaciones neuronales y su contribución, no sólo al desarrollo de la hiperfagia, sino también de la inhibición de la pulsatilidad de LH y la consecuente desaparición de la ciclicidad ovárica características de este estado (436,514,533-535). En resumen, los datos actuales indican que la activación de las neuronas productoras de NPY/AgRP en el núcleo ARC del hipotálamo es el resultado del efecto causado por la hipoleptinemia y, en mayor medida, la hipoinsulinemia observadas en este estado; dado que el tratamiento reconstitutivo de las citadas hormonas es capaz de revertir el aumento de la expresión en este núcleo de ambos neuropéptidos en ratas lactantes. Por el contrario y, puesto que el mismo tratamiento no afecta la ingesta ni los niveles de expresión de NPY a nivel del núcleo DM, se ha sugerido que la activación de esta segunda población neuronal productora de NPY es la principal responsable de la hiperfagia materna durante la lactancia (535). La pregunta que surge entonces es: ¿cuál o cuáles son los factores responsables de la estimulación de esta población neuronal en este estado fisiológico? Por un lado se ha demostrado que, en este núcleo existen profusas proyecciones de neuronas productoras de AgRP y α -MSH, que descargan en las proximidades de las neuronas productoras de NPY (261). Sin embargo, los receptores MC4R presentes en el DM se producen en poblaciones neuronales independientes, que posiblemente establezcan conexiones sinápticas con las neuronas NPY positivas regulando la producción de este neuropéptido. Así, la administración directa en este núcleo del agonista selectivo de los receptores MC3/MC4R, melanotán II, es capaz de reducir los niveles de ARNm de NPY y la ingesta en ratas lactantes (261). De esta

manera, se ha hipotetizado que, la reducción de la producción de POMC y el aumento de la producción de AgRP en el núcleo ARC genera una señal estimuladora en el núcleo DM, que al sobreponerse al posible efecto inhibitorio de neuronas gabaérgicas localizadas en las proximidades de las neuronas NPY positivas, daría como resultado la activación de estas últimas (Fig. 14). Otros posibles factores estimuladores incluirían la acción directa en este núcleo de la prolactina, cuyos niveles circulantes se incrementan marcadamente en respuesta al estímulo de succión. Aunque la forma larga del receptor de PRL (que media la acción biológica de esta hormona) se expresa tanto en el núcleo ARC como en el DM, únicamente se ha demostrado su colocalización con NPY en este último (536). De hecho datos de nuestro grupo y otros autores, indican que la producción de NPY en el ARC no se ve afectada en respuesta a cambios en la concentración sérica de PRL (436,536). Por el contrario, la reducción de los niveles circulantes de PRL en ratas lactantes, mediante tratamiento con bromocriptina, aunque no afecta la expresión de NPY en este núcleo si inhibe su producción en el núcleo DM (536). Sin embargo y a pesar de todas estas consideraciones no existen evidencias positivas en la bibliografía acerca de que durante la lactancia en el ratón, especie objeto de estudio en este trabajo, se produzca una estimulación de la producción de NPY en el núcleo DM. Así, el contenido de este neuropéptido en esta región hipotalámica proviene de las proyecciones que recibe de neuronas localizadas en el ARC, de tal manera que, cuando éstas son eliminadas específicamente en ratones lactantes se produce una marcada reducción de la ingesta (241) (Fig.16).

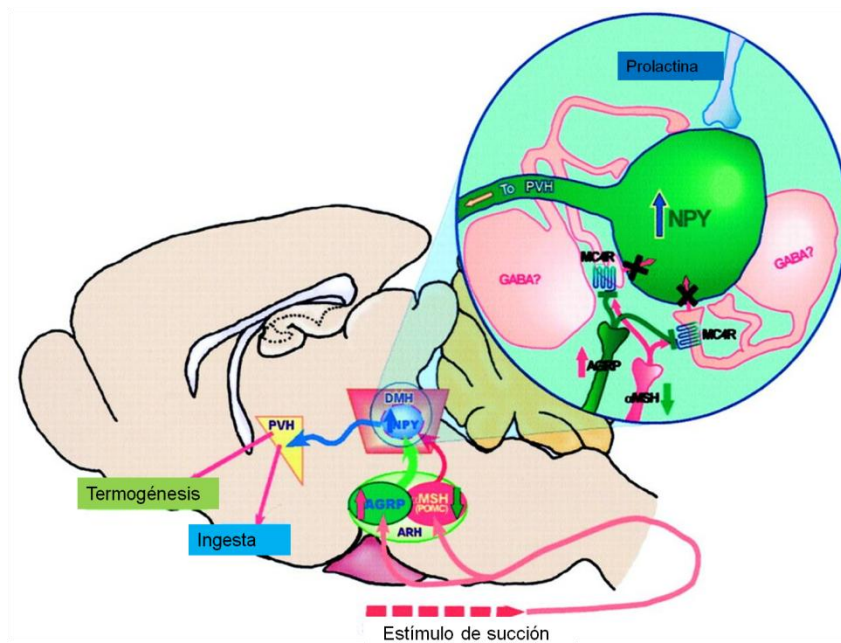


Figura 16. Esquema de los posibles mecanismos de activación de las neuronas productoras de NPY en el núcleo DM durante la lactancia en la rata. Tomado de Chen P. J. 2004, Neurosci.; 24:5091-5100

Como se mencionó en el apartado 3.1.3 de esta introducción, el núcleo PV del hipotálamo recibe profusas proyecciones tanto del ARC como del NDM por lo que, como era de esperar, también en esta región hipotalámica se producen significativas modificaciones durante la lactancia de la producción de neuropéptidos implicados no sólo en la ingesta y la termogénesis (Fig. 16), sino también en las adaptaciones conductuales asociadas a este estado (537). En concreto, se ha descrito que tanto la síntesis de CRH en este núcleo, como su liberación a la circulación portal, disminuyen significativamente durante la lactancia en ratas (538-544). Como ya se mencionó con anterioridad CRH juega un papel crucial en la regulación del eje HHA, estimulando a nivel hipofisario la secreción de ACTH que, a su vez, promueve la liberación de corticosterona por la glándula adrenal (253).

Sin embargo, al igual que ocurre en el caso de la gestación, durante la lactancia se produce una marcada atenuación de la respuesta al estrés del eje HHA, que se ha considerado como un mecanismo adaptativo esencial para minimizar el efecto deletéreo de la exposición a glucocorticoides sobre el feto y el neonato (545). Así, en presencia de distintos agentes estresantes, la hiposensibilidad de las neuronas productoras de CRH en el NPV, observada este estado fisiológico, se traduce en una menor elevación de las

concentraciones de ACTH y corticosterona plasmáticas en ratas lactantes respecto a sus controles vírgenes (471,537).

Otra de las adaptaciones fisiológicas características de la lactancia, además de la elevación de los niveles de prolactina y oxitocina, el cese del ciclo reproductivo (546) y la inhibición de la respuesta al estrés (547); es el desarrollo un estado de relativo hipotiroidismo materno, asociado con altas concentraciones plasmáticas de TSH y bajos niveles de hormonas tiroideas (548,549). Las neuronas productoras de TRH involucradas en la regulación de la secreción de PRL y TSH por la adenohipófisis están localizadas en la región medial y periventricular del NPV (véase apartado 3.1.3.2 de esta introducción). Entre los estímulos fisiológicos asociados a la activación de estas neuronas hipofisiotrópicas se encuentran la lactancia y la exposición al frío que inducen la secreción de TRH (550) y un rápido y transitorio aumento de los niveles de ARNm de pro-TRH en el núcleo paraventricular (551). De hecho en condiciones basales esta elevación de la expresión del precursor de TRH en el NPV de ratas lactantes sólo se observa en la primera semana post parto (552).

Por último, diversos autores han descrito alteraciones en la expresión de prepro-orexina y MCH a nivel de AHL durante la lactancia con desiguales resultados. Datos de nuestro grupo indicaban que la expresión de ambos neuropéptidos se encontraba disminuida en el hipotálamo de ratas lactantes a los 14 días post parto (436). Por el contrario, los resultados recogidos en otras publicaciones demostraban la ausencia de efecto de la lactancia (470,553) sobre la expresión en este núcleo de prepro-orexina y MCH o bien un efecto estimulador (554). Una posible causa de estas diferencias es la influencia del ciclo astral de los animales, utilizados en estos estudios como grupo control virgen, sobre la expresión de estos neuropéptidos (555). En conjunto, todas estas adaptaciones en los mecanismos que regulan la homeostasis energética a nivel central y periférico tienen un profundo impacto no sólo sobre la ingesta sino también sobre la termogénesis basal y adaptativa (556,557). De hecho, la capacidad termogénica y el metabolismo del tejido adiposo marrón y el músculo, implicados en este último proceso, también se ven significativamente afectados durante la lactancia. En general, en roedores, y como consecuencia de las marcadas demandas energéticas a las que se enfrenta el organismo materno, el tejido adiposo marrón sufre un proceso de atrofia funcional (558-560). Así, en la rata, si durante la última etapa de la gestación su peso se incrementaba un 65% por encima de los valores de animales no gestantes, tras el parto este involucre, se

reduciendo su tamaño progresivamente hasta alcanzar, en la segunda semana de la lactancia, su peso inicial (561). Por el contrario en el ratón la cantidad de tejido adiposo inter-escapular se mantiene elevada durante la lactancia y no retorna a los valores de los animales controles hasta transcurridas tres semanas del momento del destete de las crías (560). En ambos casos, e independientemente de los cambios en el tamaño de este depósito graso, la disminución de su capacidad termogénica es debida a una marcada reducción de su contenido mitocondrial, así como a la inhibición de la expresión proteica de las proteínas desacoplantes UCP-1 y -3, y de distintos componentes del aparato termogénico como las subunidades II y IV de la citocromo oxidasa C (562). Estos efectos son probablemente mediados por una reducción de la actividad del SNS en este tejido, que produce entre otros efectos una drástica reducción del contenido de hormonas tiroideas en el mismo (560). Estas alteraciones funcionales del TAM de la rata lactante están acompañadas, además, por una reducción de la tasa de lipogénesis y de oxidación de glucosa (tanto en estado basal como en respuesta a insulina) (505).

Al igual que en el TAM, en el músculo esquelético, se ha observado también una marcada inhibición de la expresión de UCP-1 y 3 durante la lactancia (563). Este patrón de expresión en ambos tejidos es similar al presente durante el ayuno, otro claro modelo de balance energético negativo, aunque a nivel del músculo esquelético, la regulación de UCP-3 es opuesta entre ambas situaciones, siendo disminuida su producción por la lactancia y elevada por la restricción calórica (564). De hecho, la administración de leptina exógena o la retirada de las crías son capaces de revertir el efecto de la lactancia sobre la producción de ambas proteínas desacoplantes, tanto en el TAM como en el músculo esquelético (565). Por tanto leptina actuaría, en este caso, como una señal de suficiencia energética indicando que podría reactivarse la termogénesis adaptativa suprimida durante la lactancia como consecuencia del marcado coste energético de este estado. Además, en el músculo esquelético de la madre lactante, se producen adaptaciones del metabolismo de la glucosa, similares a las que tienen lugar en el tejido adiposo. Dado que la glucosa es el principal sustrato para la síntesis de lactosa y ácidos grasos por la glándula mamaria, tanto el tejido adiposo como el músculo esquelético reducen su utilización en este estado en favor de esta última (566), cuya sensibilidad a la insulina aumenta marcadamente (567)

Paralelamente, en el tejido muscular se produce también una inhibición de la expresión de proteínas implicadas en la captación de ácidos grasos, como LPL, la translocasa de

ácidos grasos/CD36 (FAT/CD36) y la proteína transportadora de ácidos grasos FABP3, y en la oxidación de los mismos como CPT-1 (568). Este mecanismo permite, junto con el aumento de la movilización de las reservas grasas, que los FFA sean derivados a la glándula mamaria. De esta manera, el aumento de la captación de lípidos circulantes por el tejido mamario, es el principal factor causante de la disminución de la hipertrigliceridemia materna.

Los principales tejidos con capacidad lipogénica durante la lactancia son el tejido adiposo, la glándula mamaria y el hígado (509). A diferencia de estos dos últimos, la función del hígado en el metabolismo lipídico es bastante más compleja, captando AGL y oxidándolos a CO₂ o cuerpos cetónicos (cetoacetato e hidroxibutirato), que son liberados a la circulación para su uso por otros tejidos, o bien esterificándolos a triglicéridos y fosfolípidos, que son secretados entonces al torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas de baja densidad (VLDL). La mayor parte de los datos disponibles en la bibliografía acerca del metabolismo hepático durante la lactancia hacen referencia a especies de rumiantes. En estos modelos, distintos mecanismos contribuyen a un incremento de la oxidación de ácidos grasos en este tejido. Por un lado la captación de AGL por los hepatocitos es favorecida por la estimulación de la lipólisis en el TAB, junto con un incremento del flujo sanguíneo al hígado. A nivel intracelular se ha observado además una elevación de la concentración de carnitina, esencial para el transporte de los AGL de cadena larga desde el citoplasma al interior mitocondrial donde tiene lugar su oxidación, un incremento de la expresión y actividad de CPT-1. Este incremento en la tasa de oxidación de ácidos grasos junto con la elevación de la producción de cuerpos cetónicos se ha propuesto como un mecanismo de protección frente a la excesiva acumulación lipídica en este tejido durante la lactancia. Por el contrario, y a diferencia de los que ocurre en rumiantes, se ha descrito que en la rata la lactancia induce una significativa reducción no sólo de los niveles circulantes y hepáticos de carnitina y acetil-carnitina, sino también de la expresión de distintas enzimas implicadas en su biosíntesis, absorción y distribución tisular (569). De acuerdo con una situación de inhibición de la degradación de ácidos grasos, se ha observado también una reducción de los niveles de ARNm de PPAR γ y de sus genes diana CPT-1 y acil-CoA oxidasa (569) y de la capacidad cetogénica en los hepatocitos de ratas lactantes en relación con sus controles vírgenes (570). Curiosamente, y a pesar de la reducción de la ratio insulina: glucagón y otros mecanismos que favorecerían un

incremento de la oxidación de ácidos grasos, la esterificación de los mismos se incrementa igualmente durante la lactancia. Esto es debido no solo a un incremento en su captación, sino también en la actividad y la expresión de distintas enzimas implicadas en este proceso (571). El sentido fisiológico de la acumulación hepática de triglicéridos resultante no está del todo esclarecida, aunque refleja el papel de este órgano como regulador de la composición sanguínea de nutrientes (572).

En conclusión y teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, el conjunto de adaptaciones metabólicas y neuroendocrinas que tienen lugar en el organismo materno durante la gestación y la lactancia, convierten a ambos estados fisiológicos en un modelo natural idóneo para el estudio de la regulación de la homeostasis energética tanto a nivel central como periférico.

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido abordar el papel de interleuquina-6 (IL-6) en los mecanismos centrales y periféricos implicados en la regulación del balance energético durante la gestación y la lactancia con especial atención a:

- ✓ La expresión de los principales neuropéptidos hipotalámicos con funciones reguladoras tanto de la ingesta como del gasto energético.
- ✓ Su relación con las adaptaciones de la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón en ambos estados fisiológicos.
- ✓ Su papel en las adaptaciones del metabolismo lipídico que tienen lugar en ambos estados en los principales órganos con capacidad lipogénica: tejido adiposo blanco e hígado.

MATERIAL Y METODOS

1. DISEÑOS EXPERIMENTALES

1.1 Animales de experimentación

Para la realización de este trabajo se ha empleado como modelo ratones knockout de IL-6 (cepa: B6.129S2-IL6 tm1kopf/J, IL-6 KO). La estrategia para la mutación del gen de interleuquina-6 fue diseñada originariamente por Manfred Kopf y cols. (573) y transferida al fondo genético C57BL6 mediante retrocruzamiento por 11 generaciones en las instalaciones de Jackson Lab., obteniéndose una línea de ratones congénicos knockout de IL-6. Para la elección de animales control de genotipo salvaje (C57BL/6J, WT) se siguieron las recomendaciones del proveedor.

La expansión de ambas colonias de animales se realizó mediante cruces en homocigosis en las instalaciones del animalario del departamento de Fisiología de la USC (Registro N° 15005-AE). Los animales resultado de estos cruces se mantuvieron en el animalario bajo condiciones SPF (*specific-pathogen-free*-libre de patógenos) a una temperatura constante de 20°C +/- 2°C, con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas y alimentados con una dieta estándar (2019s, Harlan-Tekland, composición: 23% grasa, 20% proteínas, 57% carbohidratos; energía total metabolizable: 3,4 Kcal/g).

1.2 Modelos experimentales (gestación y lactancia)

Los experimentos realizados en este trabajo, destinados a analizar el papel de IL-6 en los mecanismos reguladores de la homeostasis energética durante la gestación y la lactancia se llevaron a cabo en ratones hembra deficientes en esta citoquina y sus controles de genotipo salvaje de 12 semanas de edad, momento en el cual los ratones presentan un elevado índice de fertilidad (386) y los animales deficientes en IL-6 todavía no han desarrollado su fenotipo obeso.

Para todos los estudios realizados (análisis de composición corporal, ingesta y gasto energético basal, estudios bioquímicos, regulación hipotalámica...) se utilizaron los siguientes grupos experimentales independientes en cada genotipo n=5-21 animales por grupo/ dependiendo del procedimiento experimental:

- Ratones hembra vírgenes en fase diestro.

La fase del ciclo estral (574) de cada una de las hembras empleadas se determinó mediante frotis vaginales realizados diariamente siendo utilizadas como controles sólo aquellas que presentaban como mínimo dos ciclos regulares. Las hembras vírgenes de cada genotipo se seguían durante dos ciclos completos y se sacrificaban a la misma edad que las gestantes correspondientes durante la fase diestro de su ciclo estral, en la que los niveles circulantes de esteroides gonadales son mínimos.

- Ratones hembra gestantes de:

- ✓ 7 días post coitum, punto temporal correspondiente a la fase de máxima acumulación de grasa y de mayor sensibilidad a la acción de la insulina (430).
- ✓ 13 días post coitum, inicio de la fase catabólica de la gestación como consecuencia del aumento de la actividad y la expresión de LSH que comienza a observarse entre los días 12 y 15 de preñez en la rata (476).
- ✓ 18 días post coitum, punto temporal donde tiene lugar la máxima movilización de las grasas maternas (388).

Para obtener ratones gestantes dos ratones hembras en proestro (575), y un ratón macho del genotipo correspondiente eran transferidos a una nueva caja. A partir de este momento los animales eran revisados cada mañana para detectar la presencia de tapón vaginal que se consideró como indicativo del día 0 de gestación. Las hembras gestantes eran entonces transferidas a cajas individuales.

- Ratones hembra lactantes a los:

- ✓ 7 días post parto, correspondiente a la fase inicial de la lactancia, en la cual comienza la movilización de las reservas grasa acumuladas durante la gestación para hacer frente a las demandas energéticas de la producción láctea como consecuencia del mayor estímulo lactopoyético.

- ✓ 14 días post parto, correspondiente al pico de lactancia, donde las adaptaciones metabólicas características de la lactancia (lipolisis e hiperfagia) son más marcadas como consecuencia del mayor estímulo lactopoyético.

Para la obtención de animales lactantes se siguió el mismo protocolo que el anteriormente citado para el modelo de gestación. Tras el parto, sólo se aceptaron para el estudio las hembras lactantes que conservaban un número mínimo de 5 crías y hasta un máximo de 8 crías, con el fin de anular las diferencias en el estímulo lactopoyético entre las distintas madres, puesto que no se podía reajustar el número de crías debido al gran índice de canibalismo en los primeros días de lactancia en las madres manipuladas.

El análisis longitudinal para el estudio de la influencia de IL-6 en la ingesta y peso corporal durante la gestación se iniciaba a partir del momento en que se detectaba el tapón vaginal, tras el que, tanto la ingesta como el peso corporal eran monitorizados diariamente hasta el día 18 de gestación. La medida de ingesta se realizó pesando una vez por semana entre las 9:00-11:00 AM la comida sobrante en el comedero y sustrayéndola de la añadida la semana anterior, y teniendo en cuenta la cantidad de comida detectada en el lecho de las jaulas.

En cuanto al período de lactancia la ingesta y peso corporal se monitorizaban a partir del día 5 y hasta el día 14 de lactancia puesto que la manipulación de la madre en días previos incrementaba el estrés que conllevaba a la mayor incidencia de canibalismo de las crías como ya se ha descrito previamente por otros autores (576).

Una vez alcanzado los puntos temporales de gestación o lactancia arriba indicados los animales fueron sacrificados tras ser anestesiados previamente con una mezcla de ketamina/xylacina (100mg/kg: 10 mg/kg; Ketamina: Imalgene 1000, Merial Laboratorios, Barcelona y Xilacina: Rompun, Bayer HealthCare, Barcelona); administrada mediante inyección intraperitoneal.

Las muestras de sangre obtenidas mediante punción cardíaca bajo anestesia se recogieron en tubos para suero (Multivette 600Z, Sarstedt). Seguidamente se centrifugaron a 12000 r.p.m durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se recogió y se guardó a -80°C hasta su análisis.

Las muestras de los distintos tejidos (hígado, TAB, TAM, cerebro e hipotálamo), una vez extraídos, se mantuvieron en hielo seco y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

2. ANALISIS DE COMPOSICIÓN CORPORAL

El análisis de composición corporal se llevó a cabo mediante dos métodos: Resonancia magnética y disección y pesada de los depósitos grasos.

2.1 Resonancia magnética

En cada punto temporal de la gestación estudiado, se determinó la composición corporal de cada animal no anestesiado mediante relaxometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) utilizando el equipo EchoMRI® (*Magnetic Resonance Imaging*, Echo Medical Systems, Houston, EE.UU) (Fig.17). Este equipo nos permite obtener una medida de los valores de masa grasa total, masa magra y agua de cada animal. Estas medidas se realizaron por duplicado. Este estudio no pudo realizarse en el modelo de lactancia debido a la imposibilidad de manipulación de las hembras durante la lactancia a fin de evitar el canibalismo de las crías.

En general, las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) se basan en la creación de contrastes entre tejidos blandos, aprovechando las diferencias en los tiempos de “relajación” de los espines de los átomos de hidrógeno y/o de la densidad del mismo en los tejidos objeto de estudio. Como consecuencia se generan señales de radio frecuencia por parte de los núcleos de hidrógeno debido al movimiento de precesión de los ejes de giro. La amplitud, duración, y distribución espacial de estas señales de radio frecuencia están en estrecha relación con las propiedades del material investigado mediante RMN. El contraste producido por los diferentes tejidos como masa grasa, masa magra, fluidos corporales y músculo, sobre la base de amplitud de la señal de RMN y tiempo de relajación es lo suficientemente alto como para ser detectado y estimado, y puede ser a mayores potenciado por la aplicación de ciertas señales de radiofrecuencia. Obtenido de la página web de Echo Medical Systems, LLC Houston, TX, EE.UU en <http://www.echomri.com>.



Figura 17. Equipo de resonancia magnética, EchoMRI®
(*Magnetic Resonance Imaging*, Echo Medical Systems,
Houston, EE.UU).

2.2 Disección y pesada de los depósitos grasos

Tras el sacrificio, el análisis de la composición corporal de cada animal se analizó mediante la disección y pesada de distintos depósitos grasos en el que se diseccionaron y pesaron los distintos depósitos grasos abdominales (tejido adiposo mesentérico, gonadal y retroperitoneal).

3. ANÁLIS DE GASTO ENERGÉTICO, COEFICIENTE RESPIRATORIO Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA

El gasto energético, coeficiente respiratorio y la actividad locomotora fueron estudiados mediante el sistema de monitorización metabólica LabMaster®, (TSE Systems, Bad Homburg, Alemania). Este equipo, consiste en un sistema de calorimetría indirecta de circuito abierto que permite la medida de entre otros parámetros el gasto energético o consumo calórico, el coeficiente respiratorio o medida de la utilización del sustrato ($RER = VCO_2 / VO_2$, siendo V el volumen) y la actividad locomotora espontánea tanto en el plano horizontal (XT) como vertical (Z). La suma de ambos valores se contempla como actividad locomotora total (plano vertical más plano horizontal; $XT+Z$). A la hora de detectar el movimiento en los ejes, el sistema dispone de haces de infrarrojos cruzando la jaula, que informan del número de interrupciones de los mismos provocadas por los animales con su movimiento en ambos planos.

Los animales destinados a la determinación de estos parámetros fueron estabulados en jaulas de entrenamiento, que imitan las condiciones ambientales de las jaulas de medida (un mismo sistema de acceso a la comida y a la bebida), durante un periodo de tres días para la adecuada aclimatación ambiental. Posteriormente, fueron trasladadas a las jaulas donde finalmente se realizarían las medidas en los días de gestación estudiados, concretamente 7, 13 y 18 días.

El gasto energético y el coeficiente respiratorio se midieron en intervalos de tiempo de 20 minutos mientras que la actividad física se media continuamente durante el transcurso del experimento.

4. ENSAYOS COLORIMÉTRICOS ENZIMÁTICOS

4.1 Determinación cuantitativa de glucosa en suero

La determinación de los niveles de glucosa en suero se realizó empleando el método colorimétrico enzimático de la glucosa oxidasa empleando un ensayo comercial (*Glucose, Spinreact*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En resumen, el principio de este método se basa en la reacción de oxidación de la glucosa presente en muestras de suero, catalizada por la glucosa oxidasa que oxida a la glucosa originando ácido glucónico y H_2O_2 . El peróxido de hidrógeno liberado reacciona con un cromógeno (fenol/4-aminoantipirina) para dar una quinona que absorbe entre 492 y 550 nm.

La intensidad del color generado por el producto final formado en esta reacción es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra problema.

Para la realización de esta determinación a 200 µl de mezcla de reactivo de trabajo se añadieron 2 µl de muestra problema, en placas multipocillo. Cada muestra fue analizada por duplicado y tras 20 minutos de incubación la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm de la mezcla de reacción se midió empleando un lector de ELISA (*BIO-RAD, model 550*)

4.2 Determinación cuantitativa de colesterol en suero

La determinación de los niveles de colesterol total en suero se realizó empleando un método colorimétrico enzimático empleando un ensayo comercial (*Colesterol, Spinreact*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ensayo del colesterol involucra reacciones enzimáticas secuenciales en las que la enzima colesterol esterasa hidroliza los esteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos libres. La colesterol oxidasa entonces oxida al colesterol para formar 4-colestenona y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa cataliza la oxidación con peróxido de hidrógeno de 4-aminofenazona y el producto final es un colorante quinoneimina el cual absorbe a 520nm. La intensidad de color a 520 nm es directamente proporcional a la concentración del suero del colesterol total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra problema.

Para llevar a cabo la determinación de los niveles de colesterol se emplearon 2 µl de suero y 200 µl de mezcla de reactivo de trabajo todo ello por duplicado. Tras 10 minutos de incubación, se midió la absorbancia mediante lector de ELISA (*BIO-RAD, model 550*) a una longitud de onda de 490 nm.

4.3 Determinación cuantitativa de triglicéridos en suero

La determinación de los niveles de triglicéridos en suero se realizó empleando un método colorimétrico empleando un ensayo comercial (*Triglycerides, Spinreact*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuencia de reacciones que tienen lugar en este ensayo, comienzan con la hidrólisis de los triglicéridos al incubarse con LPL liberándose glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol formado es sustrato de una glicerol quinasa que en presencia de ATP lo fosforila a glicerol 3P. Este producto de reacción es posteriormente oxidado produciéndose la liberación de peróxido de hidrógeno que por acción de la peroxidasa da lugar a una quinona roja que es proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra problema. Tras 10 minutos de incubación, se midió la absorbancia mediante lector de ELISA (*BIO-RAD, model 550*) a una longitud de onda de 505nm.

Para la realización de la determinación de los niveles de triglicéridos se emplearon 10 µl de muestra y 1 ml de mezcla de reactivo de trabajo todo ello por duplicado. La absorbancia se midió empleando un espectrofotómetro a 505 nm.

5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS EN HÍGADO: TINCIÓN CON OIL-RED

La tinción de Oil-Red es una técnica específica para la detección de lípidos debido a sus propiedades liposolubles consecuencia de su ausencia de carga.

Para el estudio del contenido lipídico en hígado se realizaron cortes histológicos de 8 µm de espesor empleando un criostato (Leica® CM 1850 UV, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Alemania) a una temperatura de -20°C y se montan en portaobjetos.

La tinción empleada consiste en una disolución saturada en propilenglicol (1,2-propanodiol) (*Sigma Aldrich*) del colorante Oil-Red (*Sigma Aldrich*)

Para llevar a cabo la tinción de los cortes histológicos de hígado previamente debe prepararse el tejido hepático. Por ello, los cortes histológicos de hígado se secan a temperatura ambiente durante unos 2 minutos aproximadamente y se fijan durante 30 minutos en paraformaldehído (PFA) 4% en tampón fosfato PB 0.1M (PB: *Phosphate Buffer*). Posteriormente se eliminan los restos de fijador con agua durante un minuto, tras lo cual se realiza un lavado con propilenglicol durante 10 minutos, a fin de eliminar el agua intersticial del tejido para así poder sustituirla por el colorante.

Una vez preparados los cortes histológicos se sumergen en una solución stock de 2% de Oil-Red (Sigma 0-0625) en 99% de isopropanol (Sigma I-0398) preparada 20 minutos antes de la inmersión de los portas. Esta solución debe diluirse con agua para realizar la tinción, en una proporción 3:2(Oil Red O 2% stock: agua), y filtrarse con un filtro de algodón. Tras la tinción con Oil-Red se realiza una contratinción con solución de hematoxilina Gill.NO 3 (*Sigma Aldrich*) (tinción específica para núcleos) durante 30 segundos. Finalmente los portas se montan en un medio acuoso Aquatex (aqueous mounting agent) (*Merck*) para en último término realizar la observación al microscopio óptico y captura de imágenes representativas con el programa *Viewfinder Lite*.

La cuantificación del contenido lipídico en estas imágenes representativas se realizó empleando el programa ImageJ 1.33 (National Institutes of Health, EEUU), y su

algoritmo de deconvolución de color que permite separar capas de distintas tinciones en una imagen pre-calibrada, tal y como habían descrito previamente Monaco y cols. (577). Así utilizando la opción para la tinción con hematoxilina-eosina es posible la separación de capas de color rojo, verde y azul en la imagen original. Las imágenes azules fueron utilizadas para la determinación de número de núcleos presentes el campo visual, asumiendo que estos correspondían con el número de células. La presencia de gotas lipídicas se determinó utilizando las imágenes de coloración roja. De esta manera, el tinción media por célula (TMC) fue calculada utilizando la siguiente ecuación: $TMC = \text{intensidad de tinción total} / \text{número total de células}$.

6. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ARNm

6.1 Extracción del ARNm total

Para la obtención de RNA total, las muestras de los diferentes tejidos estudiados (hígado y grasa abdominal), de aproximadamente 50mg, se homogenizaron mecánicamente (Polytrón) en Trizol (*Invitrogen*) empleando un volumen de 400µl para el hígado y 500 µl en el caso de la grasa. Finalizada la homogenización se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos tras lo cual se añadió cloroformo en un volumen correspondiente a 200 µl por cada ml de Trizol y se agitaron, dejándose posteriormente en reposo de dos a tres minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12000 g y 4°C. Tras esta primera centrifugación se obtuvieron tres fases: una fase acuosa donde se encuentra el ARN, una fase intermedia que contiene el ADN y una fase inferior que contiene las proteínas. La fase acuosa se recogió en un nuevo eppendorf al que se añadió isopropanol (en un volumen equivalente a 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol), se agitó y se dejó un mínimo de 10 minutos a -20°C.

Durante esta fase se produce la precipitación del RNA. Transcurrido este tiempo a -20°C se decantó el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol al 75% (para lavar el precipitado) y tras una agitación corta se centrifugó durante 5 minutos a 12000 g y 4°C. El sobrenadante obtenido tras esta centrifugación se decantó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante unos minutos. Una vez seco y libre de etanol 75% se resuspendió en agua DEPC (agua DEPC: dietilpirocarbonato (DEPC) 1:1000 en agua Mili-Q®).

Para la determinación de la concentración de ARN, se tomaron alícuotas de 4µl de cada muestra en 1 ml de agua DEPC y se midieron en un espectrofotómetro (DU-62, Beckman) a 260nm.

6.2 Retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción se realizó a partir de 500 ng de ARN para muestras de grasa o de 200 ng de ARN en el caso de muestras de hígado.

La mezcla de la reacción para la RT de cada muestra cuyo volumen final era de 30 µl contenía:

- 1.5 µl de MgCl₂ 50mM, (*Invitrogen*)
- 6 µl de tampón de RT (5x first strand buffer, *Invitrogen*)
- 0.17 µl de cebadores (3 µg /µl random primers, *Invitrogen*)
- 6 µl de mezcla de dNTPs (dTTP, dCTP, dGTP, dATP con una concentración de 10mM de cada uno, *Invitrogen*).
- 0.25 µl de inhibidor de RNasa (40U/µl de RNase OUT, *Invitrogen*).
- 2 µl de MMLV retrotranscriptasa (200 U/µl, *Invitrogen*).
- Volumen de muestra necesario para obtener la concentración necesaria de ARN para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción.
- Volumen correspondiente de agua milliQ para obtener el volumen final de 30 µl.

Además en cada RT efectuada se realizó un control negativo o –RT que consistía en 30 µl de mezcla de reacción a excepción de la MMLV cuyo volumen era sustituido por H₂O milliQ.

Una vez preparadas las mezclas de reacción, se incubaron en un termociclador, realizando el siguiente programa:

1. 37°C durante 50 minutos.
2. 42°C durante 15 minutos.
3. 95°C durante 5 minutos.
4. Finalmente las muestras se mantenían a 4°C.

6.3 PCR en tiempo real (Taqman)

Para el estudio de los niveles de expresión de enzimas asociadas al metabolismo lipídico hemos empleado la técnica de PCR en Tiempo Real (TAQMAN)

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa es una variante de la PCR tradicional utilizada para la cuantificación de ADN o de ARN mensajero (ARNm) de una muestra. Utilizando cebadores específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN.

La PCR en tiempo real, presenta una serie de ventajas frente a la PCR tradicional. Así por ejemplo, esta última no permite detectar pequeños cambios de expresión, dada la baja resolución del gel de agarosa y además muestra baja precisión y menor sensibilidad que la PCR en tiempo real. En la PCR en tiempo real, en cambio, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia es posible medir en el transcurso de la fase de amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento. Este hecho ocurre gracias a que la emisión de fluorescencia producida en la reacción, es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Además el análisis de los datos y cuantificación del producto se realiza en la fase exponencial de la PCR, lo que confiere una elevada precisión.

En nuestro estudio hemos empleado el sistema de detección de sondas de hibridación específicas. Este método de detección consiste en sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. En este trabajo, hemos empleado sondas de hidrólisis también denominadas también sondas TaqMan. *Las sondas de hidrólisis* son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' (reporter) que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' (quencher) que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera ha de solaparse con el espectro de absorción de la segunda.

La fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Así, la ADN polimerasa al desplazarse a lo largo de la cadena en su acción de síntesis, debido a su actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como el donador y aceptor se alejan espacialmente, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Fig.18).

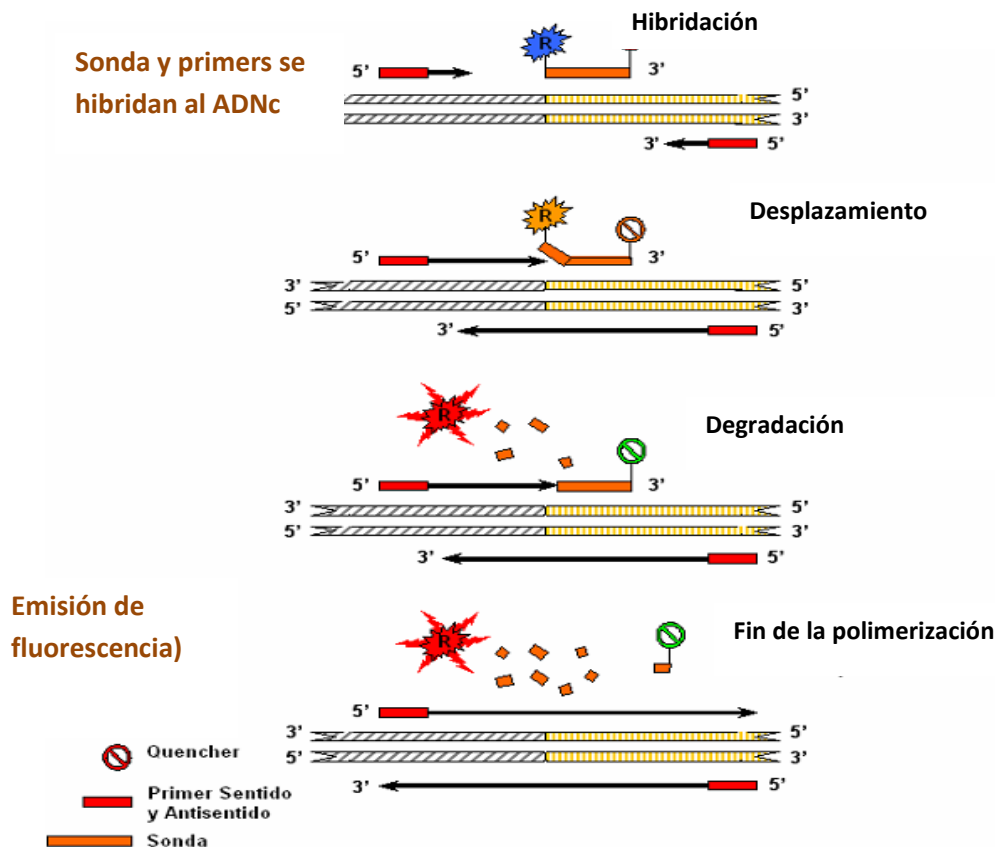


Figura 18. Mecanismo de las sondas de hidrólisis (Taqman)

El fluorocromo utilizado para la realización de la PCR ha sido TAMRA que posee un máximo de absorción de 560nm y un máximo de emisión de 580 nm.

Los cebadores y las sondas empleados fueron utilizados previamente por otros autores (152,393-398) y su correspondencia con las secuencias de los genes a estudiar se comprobaron mediante la base de datos BLAST y se muestran en la (Tabla 2).

Gen	Secuencia de cebadores Código de ensayo Applied Biosystems	Tamaño amplicón (pb)	Nºacceso Gene bank	Referencias
Rn18s	sentido:5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3' antisentido:5'-CGAACCTCCGACTTTCGTTCT-3' sonda:5'-CCGGCGCAAGACGGACCAGA-3'	101	NR_003278.1	Capurso G. y cols, 2006
IL-6	sentido:5'-CTATACCACTTCACAAGTCGGAGG-3 antisentido:5'-TGCACAACCTCTTTTCTCATTTCC-3 sonda:5'-TTAATTACACATGTTCTCTGGGAAATCG-3'	76	NM_031168.1	Rioja I. y cols, 2004
IL-6Rα	Mm00439653_m1	98	NM_010559.2	
Receptor α2	Mm00845383_s1	86	NM_007417.4	
Receptor β3	Mm00442669_m1	57	NM_013462.3	
Deiodinasa 2	Mm00515664_m1	77	NM_010050.2	
LPL	sentido:5'-AAGCTGGTGGGAAATGATGTGG-3' antisentido:5'-CCGTTCTGCATACTCAAAGTTAGG-3' sonda:5'-CTTGGAGCCCATGCTGCTGGC-3'	194	NM_008509.2	Sukonina V. y cols, 2006
HSL (Lipe)	sentido:5'-CGCAGAAGACAACATGGCCT-3' antisentido:5'-TAGACAGCCGCCGTG-3' sonda:5'-CTCAAGCCAGGCCAGGAGAGA-3'	64	NM_010719.5	Cong L y cols, 2007
ACC	sentido: 5'-TGCAGATGACTTCCCTAACCTCTT-3' antisentido:5'-CCAGATGTCGAGATTGTTTTCG-3' sonda:5'-AGGTTCAAGCTGAAGTTCCTGGATCACCTATATTT-3'	74	NM_1133360	Takahashi y cols, 2005
FAS	sentido: 5'-ATCCTGGAACGAGAACACGATCTGGT-3' antisentido:5'-AAGTCCAGGAGTGACACGTCTCT-3' sonda:5'-GGAGCGTATATGTGAACAGCGCA-3'	139	NM_007988.2	Takahashi y cols, 2005
PPAR-γ	sentido:5'-TACATAAAGTCCTTCCCGCTGAC-3' antisentido:5'-GTGATTTGTCCGTTGTCTTTTCT-3' sonda:5'-CAAGATCGCCCTCGCCTTGGCTT-3'	72	NM_011146.3	Heijboer, AC y cols, 2005
PGC-1α	sentido:5'-TTTTTGGTGAAATTGAGGAATGC-3' antisentido:5'-CGGTAGGTGATGAAACCATAGCT-3' sonda:5'-GTCTCCATCATCCCCGAGATTTACGG-3'	72	NM_008904.1	Heijboer, AC y cols, 2005
PGC-1β	Mm00504720_m1		NM_133249.2	
ERRα	Mm00433143_m1	133	NM_007953.2	
NRF-1	Mm01135606_m1	59	NM_010938.3	
UCP1	sentido:5'-GCAGATATCATCACCTTCCCG-3' antisentido:5'-CCTGGCCTTCACCTTGGAT-3' sonda:5'-TGGACACTGCCAAAGTCCGCCTT-3'	66	NM_009463.2	Mashiko S y cols, 2003
UCP3	sentido:5'-GAAGATGGTGGCTCAGGAGG-3' antisentido:5'-AAGCTCCCAGACGCAGAAAG-3 sonda:5'-CCACGGCCTTCTACAAAGGATTTGTGC-3'	73	NM_009464.3	Mashiko S y cols 2003

Tabla 2. Cebadores y sondas empleados en la PCR en tiempo real (Taqman)

La mezcla de la reacción de PCR cuyo volumen final era de 12 μ l estaba constituida por:

Agua MiliQ®.....	2.92 μ l
Oligonucleótido sentido (10 μ M)	0.36 μ l
Oligonucleótido antisentido (10 μ M).....	0.36 μ l
Sonda (5 μ M).....	0.36 μ l
TaqMan Universal PCR máster mix; (<i>Applied Biosystems</i> ; <i>Barcelona</i>).....	6 μ l
Muestra (RT).....	2 μ l

Además de las muestras problema, se añadió un control negativo (-RT), un blanco y 6 muestras para la realización de una curva patrón tanto para el gen problema como para el *housekeeping* o gen constitutivo, todo ello por duplicado.

La curva de eficiencia o curva patrón se realizó a partir de una mezcla de muestras (RTs) que contenía un volumen de 2 μ l de cada una de las reacciones de retrotranscripción (RTs) y a partir del cual se obtendría el primer punto de la recta y los restantes 5 puntos mediante diluciones consecutivas 1:4.

La reacción de PCR se realizó empleando 7300 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*) gestionado por el programa informático 7300 System Software® (*Applied Biosystems*).

Las condiciones de amplificación empleadas incluyen un ciclo inicial de desnaturalización a 50°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de: 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto

Para el análisis de los datos hemos empleado el método *Pfaffl* (399) que permite medir el cambio del gen diana que se normaliza frente al gen referencia y que se aplica cuando las eficiencias de ambos no son del 100% y por tanto difieren. Como gen referencia hemos empleado el gen constitutivo 18S.

El valor de las eficiencias de cada gen (referencia y gen problema) viene determinado por la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

La cuantificación relativa viene determinada por la fórmula:

$$\text{Cuantificación relativa} = \frac{E_{\text{gen}}^{\Delta\text{CP gen (control - muestra)}}}{E_{\text{referencia}}^{\Delta\text{CP referencia (control - muestra)}}$$

Donde:

- **E gen:** eficiencia del gen diana o target (LPL por ejemplo).
- **E referencia:** eficiencia del gen referencia o control endógeno (18S).
- **ΔCP diana (control-muestra):** cambio en los valores de los ciclos umbral (CP = CT) del gen diana entre la muestra calibradora (control) y la muestra experimental (muestra).
- **ΔCP referencia (control-muestra):** cambio en los valores de los ciclos umbral (CP = CT) del control endógeno entre la muestra calibradora (control) y la muestra referencia o experimental (muestra)

6.4 Hibridación *in situ*

6.4.1 Cortes histológicos

Los cerebros de ratón empleados para la realización de la hibridación *in situ* se mantuvieron en hielo seco desde el momento de su obtención y posteriormente se guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

Para la realización del análisis del ARNm de los distintos neuropéptidos estudiados en este trabajo, se realizaron cortes histológicos de dichos cerebros en secciones coronales de 16 μm de espesor con un criostato (Leica® CM 1850 UV, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Alemania) a una temperatura de -20°C.

Los cortes obtenidos se colocaban en portaobjetos con polilisina (Polysine, ThermoScientific®). Con el fin de comparar idénticas regiones cerebrales, los cortes fueron elegidos con ayuda de un atlas de cortes histológicos de cerebro de ratón (400). Para la realización de este trabajo se emplearon sondas marcadas radiactivamente con el isótopo radiactivo ³⁵S puesto que las sondas marcadas con isótopos radiactivos ofrecen una alta sensibilidad así como una alta resolución al igual que las no marcadas

radiactivamente pero sin el inconveniente de la difícil detección de secuencias no repetitivas ni los problemas de fondo en tejidos ricos en la molécula marcada o la difícil cuantificación de la molécula marcada que presentan estas últimas (578,579). Las sondas utilizadas en este trabajo fueron sondas de oligonucleótidos complementarios al ARNm de los neuropéptidos hipotalámicos AgRP, CRH, POMC, NPY, prepro-OX, TRH y MCH marcadas con el isótopo radiactivo ^{35}S , que fueron empelados previamente por otros autores (580-583) y cuya secuencia se muestra en la tabla 3.

ARNm	Secuencia de oligonucleótidos	c.p.m	Nº Acceso Genbank	Referencias:
MCH	5-AACTTGCCAACAGGGTCGGTAGACTCGTCCCAGCATACACCT-3	10^6	NM-029971.2	Broberger y cols., 1999
NPY	5 -GAGCGGACTATCTGGCCATGTCTCTGCTGGCGCGTC-3	$5 \cdot 10^5$	NM-010410.2	Wang y cols., 2002
Pre-OX	5-TTCGTAGAGACGGCAGGAACACGTCTTCTGGCGACAGCAGTC-3	$5 \cdot 10^5$	NM-010410.2	Yamamoto y cols., 1999
TRH	5ATACCAGTTAGGGTGAAGATCAAAGCCAGAGCCAGCAGCAACCA3	$5 \cdot 10^5$	NM-009426.2	Broberger y cols., 1999
AgRP1	5-TGCAGCAGAACTTCTTCTGCTCGGTCTGCAGTTGTCTTCTTGAGG-3	$5 \cdot 10^5$	NM-007427.2	Wang E.R y cols., 2002
AgRP2	5-TGCTTGCGGCAGTAGCAAAAGGCATTGAAGAAGCGGCAGTAGCA-3	$5 \cdot 10^5$	NM-007427.2	Wang E.R y cols., 2002
POMC	5-CGTTCTTGATGATGGCGTTCTTGAAGAGCGTCACCAGGGGCGTCT-3	10^6	NM-008895.3	Wang y cols., 2002
CRH	5-CAGTTTCCTGTTGCTGTGAGCTTGCTGAGCTAACTGCTCTGCCC-3	10^6	NM_205769.2	Nomura M y cols.2003

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en la hibridación *in situ*

6.4.2 Marcaje de las sondas

Para el marcaje de la sonda se ha empleado el isótopo de azufre $\alpha^{35}\text{S}$. El marcaje radioactivo de las sondas de ADN se realizó en el extremo 3' con [$\alpha^{35}\text{S}$] dATP43 (desoxiadenosin 5'(α -tio) trifosfato) (PerkinElmer, Waltham, EE.UU), reacción que fue catalizada por la TdT-transferasa (terminal deoxinucleotidil transferasa) (New England Biolabs, Ipswich; MA, EE.UU), capaz de catalizar la adición de nucleótidos al extremo 3' de una molécula de ADN.

La reacción de marcaje se llevó a cabo en un volumen final de 20 μl y consistió en:

- ✓ 2 µl del oligonucleótido (50 ng/µl)
- ✓ 4 µl de tampón de reacción de transferasa terminal 5X pH 7.9 (New England Biolabs, Ipswich, EE.UU)
 - 50mM acetato potásico
 - 20 mM tampón Tris-acetato
 - 10 mM acetato magnésico
- ✓ 2 µl de Cl_2Co
- ✓ 9 µl de H_2O DEPC
- ✓ 1 µl de terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT 20.000 u/ml; New England Biolabs, Ipswich, EE.UU)
- ✓ 2 µl de $[\alpha^{35}\text{S}]\text{dATP}$ (desoxiadenosin 5'(α -tio) trifosfato) (500 Ci/mMol, 10 mCi/ml; PerkinElmer, Waltham, EE.UU)

La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación se procedió a la purificación de la sonda marcada mediante separación cromatográfica de exclusión molecular a través de columnas de Sephadex G-50 (GE Healthcare, Madrid, España) previamente acondicionadas con tampón de elución (20mM Tris HCl pH 7.5, 2mM EDTA pH 8, 20mM NaCl). En este proceso se obtenían tres fracciones con 400µl del tampón de elución de las cuales la segunda fracción donde se eluye el grueso del oligonucleótido marcado, ya que la primera y tercera fracción contienen en su inmensa mayoría un exceso de oligonucleótidos no marcados. La determinación de la pureza del marcaje de la sonda de cada fracción medida en cuentas por minuto (c.p.m) se realizó en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 3801) a partir de 4 µl de cada fracción diluida en 4µl de líquido de centelleo.

6.4.3 Pre-hibridación

Los cortes histológicos se secaron rápidamente y se fijaron en paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0.2M durante 30 minutos. Posteriormente el paraformaldehído se eliminó mediante dos lavados rápidos con 0.1M PBS (tampón fosfato salino) a fin de evitar su polimerización. Una vez fijados los cortes se deshidrataron para permeabilizarlos a la sonda. La deshidratación consistió en lavados sucesivos de los cortes en concentraciones crecientes de etanol, concretamente 70, 80, 90, 95 y 100%, de 5 minutos cada uno y finalmente se secaron a temperatura ambiente.

6.4.4 Hibridación

Una vez secos los cortes coronales, se agregaron 200 mL de solución de hibridación a cada portaobjetos, compuesta por:

- ✓ SSC 4X (SSC20X:NaCl 3M, citrato sódico 0.3M; Merk),
- ✓ Formamida desionizada al 50%,
- ✓ Disolución Denhardt 1X (albúmina de suero bovino (BSA) 1%, Ficoll 1%, polivinilpirrolidona 1%) (Sigma Aldrich)
- ✓ 500 µg/µL de ADN de esperma de salmón (Sigma Aldrich),
- ✓ Sulfato de dextrano al 10% (Sigma Aldrich)
- ✓ DTT (ditiotretitol) 50mM (Sigma Aldrich)
- ✓ 5×10^5 o 10^6 c.p.m de sonda marcada dependiendo del oligonucleótido marcado.

La hibridación se realizó durante toda la noche a 42°C en una cámara húmeda.

6.4.5 Lavados

Tras la hibridación de los cortes histológicos con la sonda, éstos fueron sometidos a sucesivos lavados en agitación con SSC 1X a temperatura ambiente, con el fin de eliminar los restos de sonda no marcada. Luego se realizaron 4 lavados de 30 minutos a 55°C en SSC 1X. El último lavado se hizo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se hicieron lavados sucesivos con agua milliQ, etanol al 70% con acetato de amonio (NH_4Ac) 300mM y finalmente con etanol absoluto.

Tras los lavados, los portaobjetos se dejaron secar al aire, y se colocaron en un casete de autorradiografía (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido), con una película de autorradiografía Kodak Biomax MR film (Kodak, Rochester NY, EE.UU) durante un tiempo comprendido entre 3 y 7 días dependiendo del péptido analizado. Transcurrido el tiempo de exposición, el revelado se llevó a cabo durante 2 minutos en líquido revelador (Ilford-Harman Technology limited, Mobberley Cheshire, UK), y posteriormente 5 minutos con líquido fijador (Ilford-Harman Technology limited, Mobberley Cheshire UK).

6.4.6 Cuantificación

Las señales de hibridación obtenidas en las películas fueron escaneadas y su análisis se realizó con el programa ImageJ 1.33H (National Institutes of Health, EEUU)

La densidad de la señal óptica de cada sección se cuantificó y se corrigió por el valor del fondo adyacente. Los valores se representaron como porcentaje del grupo control.

6.4.7 Controles de la hibridación

La especificidad de las señales de hibridación se demostró mediante la realización de ensayos de desplazamiento de la señal por incubación con un exceso de sonda no marcada (Fig.19, Fig. 20). Para estos ensayos, se incubaron grupos de portaobjetos con soluciones de hibridación que contenían concentraciones crecientes de oligonucleótidos no 100x, 200X, y 500X, que permiten evaluar evaluó la competencia de la sonda marcada con la sonda fría no marcada Tal y como se puede observar en las figuras 2 y 3 la especificidad de la sonda se demuestra mediante la reducción de la señal que se hace evidente desde la concentración 100X de oligonucleótidos no marcados.

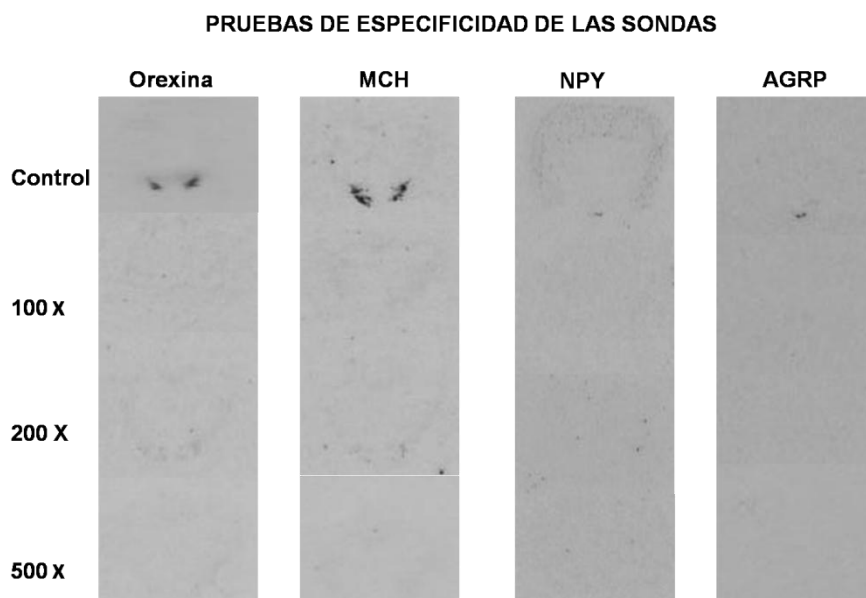


Figura 19. Pruebas de especificidad mediante el empleo de sonda no marcada en concentraciones crecientes de los distintos neuropéptidos orexigénicos estudiados

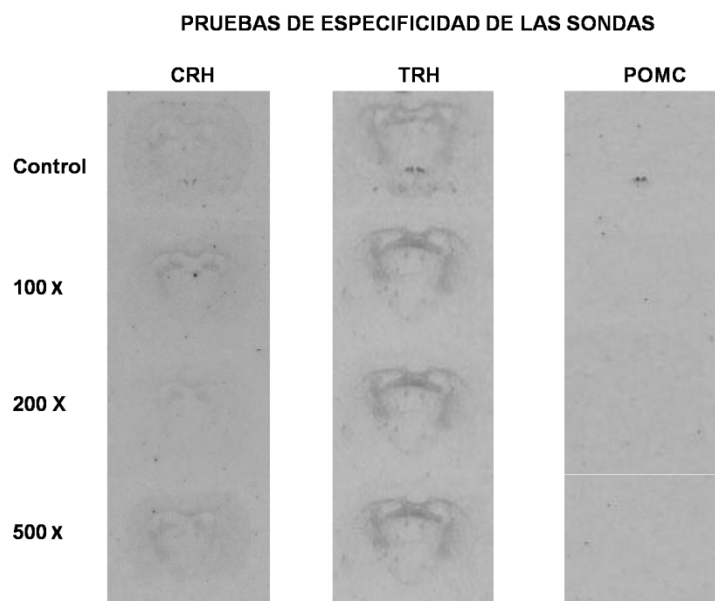


Figura 20. Pruebas de especificidad mediante el empleo de sonda no marcada en concentraciones crecientes de los distintos neuropéptidos anorexigénicos estudiados

7. DETERMINACION DE EXPRESIÓN PROTEICA

7.1 Obtención y cuantificación de extractos de proteína total

Las proteínas totales se obtuvieron mediante homogenización de 100mg de tejido (TAM) en 1 ml de tampón de lisis, empleando un homogeneizador mecánico (Polytrón®). La composición del tampón de lisis empleado fue la siguiente:

- 1mM EDTA
- 10mM Tris pH 7.5
- 0.25M Sacarosa
- 0.1% Triton X
- 0.05% Deoxicolato

En el momento previo a usar el tampón de lisis se añadió el inhibidor de proteasas (*Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor cocktail Tablets*, Roche Diagnostics

GMBH, Alemania). Se añadió una pastilla de la mezcla de inhibidores por cada 10 mL de tampón de lisis, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Una vez homogenizados los tejidos, el extracto se centrifugó a 14000 rpm, durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, constituye el extracto proteico de trabajo se guardó en diferentes alícuotas a -80°C hasta su utilización.

Las concentraciones de proteína total del lisado obtenido se cuantificaron mediante el método colorimétrico de Bradford, empleando suero bovino para la realización de la recta patrón.

7.2 Western Blot

Mediante esta técnica se analizó la expresión diferencial de las proteínas desacoplantes UCP-1 y UCP-3 en tejido adiposo marrón (TAM) a los 7,13 y 18 días post coitum.

7.2.1 Electroforesis

La separación por peso de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes SDS-PAGE (584), compuesto por dos fases: una fase superior o concentradora que permite homogeneizar la entrada de las proteínas en el gel separador, y una fase inferior o separadora que permite la separación de las proteínas exclusivamente en función del peso molecular. El porcentaje de acrilamida de esta última fase varía en función del tamaño de las proteínas a estudiar. En este estudio se emplearon geles al 10% de poliacrilamida puesto que las proteínas estudiadas presentan un peso molecular entre 31 a 50 KDalton.

Las muestras constituidas por 30µg de proteínas totales en tampón de carga Laemmli 1X (10% Glicerol, 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol, 0.0625M Tris pH 6,8 y 1% β-mercaptoetanol) se calentaron, previamente a ser cargadas en el gel, a 95°C durante 5 minutos.

Para determinar el peso de las proteínas se utilizó un marcador de pesos moleculares constituido por proteínas preteñidas de peso conocido (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, *Fermentas*)

La electroforesis se realizó en un tampón de migración formado por 25Mm de Tris Base, 190 mM de Glicina y 0.1% SDS a 120V durante aproximadamente 1 hora.

7.2.2 Transferencia

Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (*Immobilon-P*, Millipore, Billerica, MA, EEUU)

La membrana se hidrató previamente con metanol (1 minuto) y con agua Mili-Q® (3 minutos) y se acondicionó en tampón de transferencia (25Mm de Tris Base, 192mM de Glicina, 0.1% de SDS y 20% v/v de Metanol, pH: 8.3) durante 5 minutos.

La transferencia se realizó empleando un aparato de transferencia Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad) aplicando un voltaje fijo de 100V durante 1 hora y se verificó mediante la presencia del marcador preteñido, y por tinción durante 2 minutos con solución de Ponceau (Sigma Aldrich).

7.2.3 Inmunodetección

Tras la transferencia, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS-T: 5% de leche desnatada en polvo en TBS-T [NaCl 150 mM; Tris 20mM, pH 7.6; Tween 20 0.1%]) durante toda la noche, a 4°C y con agitación continua.

Una vez bloqueadas, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario UCP-1 (ab10983 (Abcam)) u UCP-3 (ab3477 (Abcam)) diluido (1:1000) en solución de bloqueo y a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se lavaron en TBS-T (3 lavados de 10 minutos) en agitación continua y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado y biotinilado, diluido (1:5000) en solución de bloqueo que es específico para la proteína objeto de estudio,

Posteriormente, las membranas se lavaron en TBS-T (3 lavados de 10 minutos cada uno).

La detección de la proteína de interés se efectuó mediante quimioluminiscencia con ECL® Western Blotting analysis system (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, *Thermo Scientific*). Cuando el anticuerpo secundario se incubaba con el sustrato y el potenciador, se emite una reacción luminosa que permite la visualización, mediante autorradiografía, de la interacción de los anticuerpos con la proteína problema.

Las membranas tratadas con el ECL[®] se expusieron en una película fotográfica (Super - RX Fuji Medical X-Ray film) para la detección de la señal.

7.2.4 Cuantificación

Las señales de inmunodetección fueron cuantificadas con el programa ImageJ 1.33H (National Institutes of Health, EEUU), midiendo su valor de densidad óptica corregido por el valor de densidad óptica de su correspondiente control de tubulina. Todos los grupos experimentales de un mismo estudio fueron expuestos en la misma película fotográfica. Los valores se representaron como porcentaje del grupo control.

7. ANÁLISIS ESTADISTICO

Los datos han sido expresados como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Los test estadísticos empleados han sido:

- Prueba t para el análisis de las diferencias de una variable de medida entre dos grupos experimentales. Los cálculos estadísticos fueron realizados además empleando métodos no paramétricos (U-Mann-Whitney), dado que lo reducido del tamaño muestral. Sin embargo el uso de métodos no paramétricos no afectó al resultado de estos análisis.
- ANOVA seguido de un test post-hoc Bonferroni en el caso de las comparaciones de una única variable entre más de dos grupos experimentales.
- ANOVA para muestras repetidas seguido de un test post-hoc Bonferroni en el caso de estudios longitudinales.

Se ha valorado como significativo un valor de $P < 0.05$. El programa informático empleado para el análisis estadístico fue GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California EEUU).

RESULTADOS

1. EFECTO DE IL-6 SOBRE LA EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA

La gestación y la lactancia son estados fisiológicos caracterizados por un elevado coste energético dirigido a garantizar el desarrollo del feto, y el mantenimiento de la producción de leche necesaria para el adecuado crecimiento neonatal; al tiempo que se mantiene una adecuada homeostasis metabólica en la madre. Ambos estados reproductivos implican un profundo ajuste de los mecanismos metabólicos y neurocrinos implicados en la regulación del peso y la composición corporal causando en último término profundas alteraciones en ambos parámetros. Múltiples evidencias experimentales indican que diversas adipoquinas producidas por la placenta así como por el tejido adiposo materno, durante la gestación y la lactancia, como leptina, adiponectina, resistina (97,435,438,440,441) o algunas citoquinas pro-inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ e IL-6, están involucradas en la génesis y mantenimiento de dichas adaptaciones en la homeostasis energética materna. Dada la escasa información existente acerca del papel de IL-6 en estos procesos nos planteamos en primer lugar analizar el posible efecto de la ausencia de esta citoquina sobre la evolución del peso corporal durante ambos estados fisiológicos. Para ello hemos utilizado un modelo de animales deficientes en IL-6 y sus correspondientes controles de genotipo salvaje (WT). Los ratones de ambos genotipos, de 12 semanas de edad en el momento del inicio del experimento, fueron asignados a tres grupos experimentales vírgenes, gestantes o lactantes (n= 15-21, para gestación y n= 12-14 para lactancia) para el seguimiento tanto de peso corporal como de ingesta a lo largo de ambos estados reproductivos.

Los resultados obtenidos indican que desde la primera semana de gestación es evidente ya una diferencia de peso significativa entre ratones gestantes y vírgenes en ambos genotipos (Fig. 21 A y B), que se incrementa exponencialmente hasta el parto. Todos los grupos de ratones IL-6 KO empleados en este estudio (vírgenes y gestantes) presentaban un menor peso corporal que los animales WT al inicio del experimento (peso medio al inicio: WT=23.36 $\pm$ 0.24g vs IL-6 KO=21.56 $\pm$ 0.23g; $p<0.001$); diferencia que no es revertida por la gestación (Fig.21), siendo el peso final de los ratones deficientes en IL-6 al término de la misma, significativamente menor que el observado en sus controles de genotipo salvaje (peso medio a los 18 días p.c.: Gestantes WT = 40.35 $\pm$ 0.53g vs. Gestantes IL-6 KO= 37.61 $\pm$ 0.82g; $P<0.05$). Sin embargo y a pesar de esta diferencia, cuando se evalúa el incremento de peso corporal respecto a los

valores previos al cruce, este es similar en ambos genotipos en todos los puntos temporales estudiados (Fig.21B). Por tanto, la deficiencia de IL-6 no afecta al incremento de peso corporal característico de la gestación.

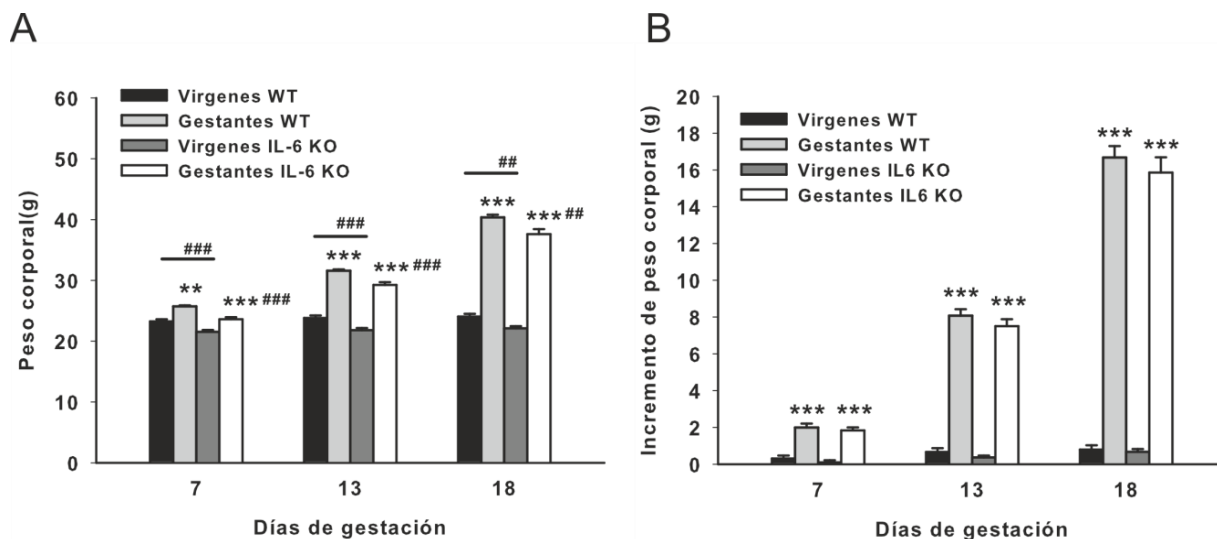


Figura 1. Peso corporal de ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación. A) Evolución del peso corporal y B) Incremento de peso corporal. Nivel de significación respecto a los controles vírgenes **P< 0.01; *P<0.001 y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo ## P<0.01 y ###P<0.001; n=15-21 animales/grupo.**

De acuerdo con estos resultados tanto el número y el peso de los fetos al término de la gestación como el de las crías al nacimiento son semejantes entre genotipos (Tabla 4).

	Gestantes 18 días (n=8-11)		Día nacimiento (n=7-8)	
	Nº crías	Peso (g)	Nº crías	Peso (g)
WT	8.09±0.57	1.52±0.06	7.33±0.9	1.25±0.01
IL-6 KO	8.01±0.46	1.57±0.04	7.32±0.8	1.28±0.01

Tabla 1. Número de fetos y crías, y sus correspondientes pesos al día 18 de gestación y al día de nacimiento.

A continuación, en un grupo independiente de animales se analizó el efecto de la deficiencia de IL-6 sobre el peso corporal durante la lactancia. En este segundo experimento se mantenía la diferencia de peso inicial entre ratones WT e IL-6 KO (peso medio al inicio: WT=21.18±0.21g vs IL-6 KO =18.75±0.29g; P<0.001) y de nuevo esta no se veía afectada por la gestación (peso medio a los 13 días p.c.: WT= 31.73±0.98g vs IL-6 KO=28.8±0.69g; P<0.05). Sin embargo una semana después del parto el peso de las madres lactantes de ambos genotipos se iguala, manteniéndose por encima de los valores de sus controles vírgenes hasta los 14 días de lactancia (Fig.22). Al calcular el incremento de peso en la última etapa del ciclo reproductivo, y a diferencia de lo que ocurría al tener en cuenta únicamente la etapa de gestación, observamos que este era superior en ausencia de IL-6 tanto a los 7 como a los 14 días de lactancia (Fig.22).

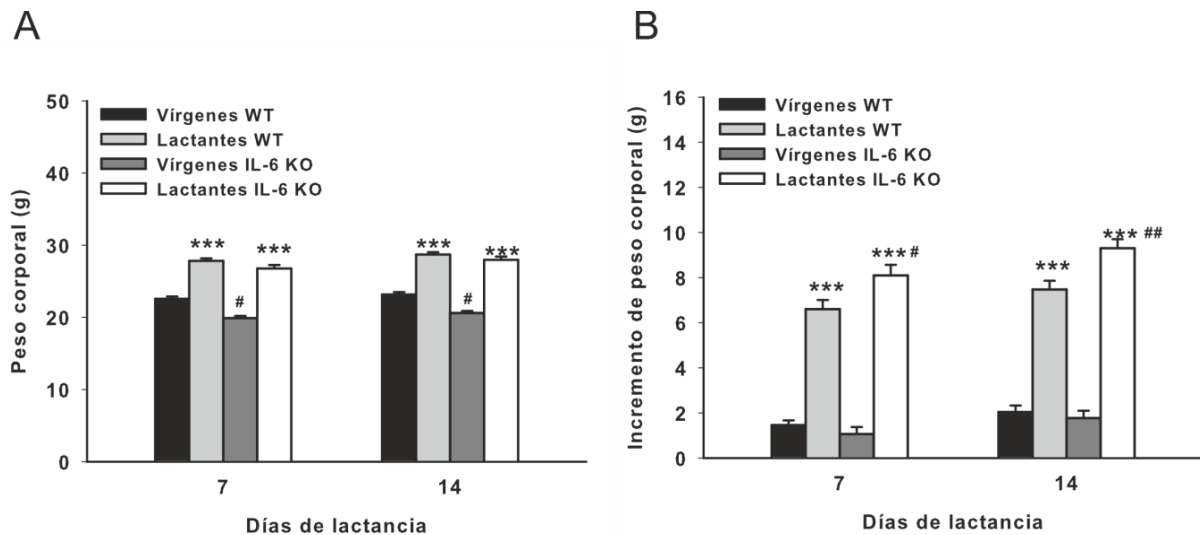


Figura 2. Peso corporal de ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia. A) Evolución del peso corporal y B) Incremento de peso corporal. Nivel de significación respecto a las controles vírgenes *P< 0.001 y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # P<0.05 y ## P<0.01; n=12-14 animales/grupo.**

Esto parece no ser debido a un mayor estímulo lactopoyético dado que, tanto el número como el peso de las crías en ambos puntos temporales estudiados, así como al final de la lactancia, es similar entre genotipos (Tabla.5). Teniendo en cuenta los profundos ajustes que tienen lugar en la composición corporal de la madre gestante y lactante (véanse apartados 6.1 y 6.2 de la introducción), esta observación parece indicar la posibilidad de que cambios en el metabolismo energético materno en ausencia de IL-6 podrían favorecer un mayor acúmulo de grasa corporal durante la lactancia.

	Lactantes 7 días (n=11-15)		Lactantes 14 días (n=15)		Lactantes 21 días (n=8-9)		
	Nº crías	Peso (g)	Nº crías	Peso (g)	Nº crías	Peso machos (g)	Peso hembras (g)
WT	6.21±0.34	3.14±0.15	6.5±0.43	6.18±0.21	5.87±0.30	10.44±0.43	9.76±0.43
IL-6KO	6.7±0.62	3.21±0.08	6.5±0.38	5.96±0.10	6.44±0.70	10.51±0.46	9.50±0.45

Tabla 2. Número de crías, y sus correspondientes pesos en los días 7, 14 y 21 de lactancia.

1.1 Composición corporal: resonancia magnética

El aumento de peso corporal característico de la gestación es debido, además de al desarrollo del feto y la placenta, a profundas alteraciones en la composición corporal materna que se prolongan durante el periodo de lactancia y afectan al tamaño de órganos clave en el metabolismo lipídico como el tejido adiposo y el hígado (426).

Con el fin de evaluar el posible papel de IL-6 en estas adaptaciones morfológicas, se realizó un estudio longitudinal, en el que se analizó la evolución del contenido de masa grasa y magra en nuestro modelo mediante la técnica de resonancia magnética. Para ello se utilizó un Bruker Minispec Instrument (Echo Medical Systems, Houston, TX) en el que se pueden analizar estos parámetros en ratas y ratones en ausencia de anestesia. Para llevar a cabo este estudio se emplearon ratones hembra de mayor edad (15 semanas de edad al inicio del experimento) que los empleados en estudios previos a fin de minimizar en la medida de lo posible las diferencias de peso existentes entre genotipos al inicio del estudio. De hecho aunque los animales IL-6 KO empleados en este estudio tenían un peso corporal inicialmente inferior al de sus controles WT, esta diferencia no llegaba a ser significativa (WT=20.26±0.32g vs. IL-6 KO=19.68±0.28g; P=0.199).

Como puede observarse en la Fig.23 A panel izquierdo, la gestación induce un marcado incremento en el contenido de grasa corporal total en ambos genotipos, que es evidente ya a los 7 días p.c. ($P<0.05$ vs día 0 de gestación) y se mantiene a lo largo de toda la gestación ($P<0.001$ para 13 y 18 días p.c. vs día 0 de gestación). Los resultados obtenidos en este estudio confirman el mayor acúmulo de grasa corporal en los ratones IL-6 KO durante la primera etapa de la gestación (7 días p.c.), tanto cuando se evalúan los datos en valor absoluto como corregidos por su peso corporal (Fig. 23 A.).

Por último, y de acuerdo con el ya descrito aumento de tamaño de diferentes estructuras maternas como el hígado o el tracto gastrointestinal (apartado 5.1 de la introducción), el contenido de masa magra incrementa progresivamente en este estado en ambos genotipos (Fig. 23B panel izquierdo), no encontrándose diferencias entre ratones WT e IL-6 KO gestantes en este parámetro a lo largo de la gestación (Fig. 23B panel derecho).

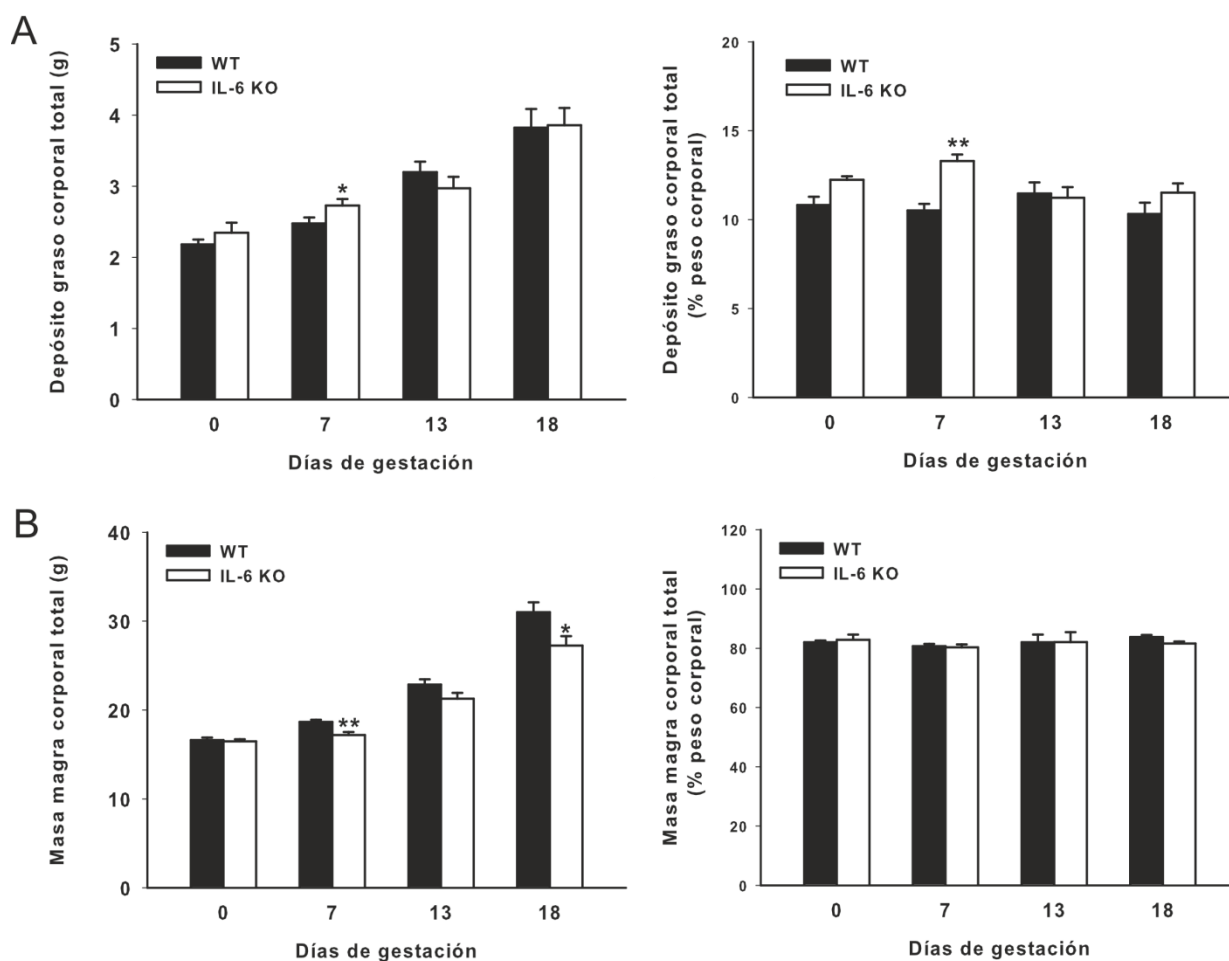


Figura 23. Distribución del depósito graso y de la masa magra corporal total en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Depósito graso, B) Masa magra; panel izquierdo, valores netos y, panel derecho, en porcentaje corregidos por el peso corporal. Nivel de significación respecto a los ratones control WT * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 8-9$ animales/grupo.

El estudio de la grasa corporal total no pudo realizarse en los animales lactantes debido a que esta técnica implica la manipulación de los ratones que en el estado de lactancia desencadena un incremento en el índice de canibalismo de las crías principalmente durante los primeros días tras el parto (585).

1.2 Composición corporal: disección y pesada de los depósitos grasos e hígado

Los resultados de composición corporal durante la gestación, obtenidos en el estudio longitudinal se confirmaron mediante un estudio transversal en el que se analizó mediante disección y pesada la evolución del tamaño de los distintos depósitos grasos así como del hígado, en ratones hembra de ambos genotipos durante la gestación (7, 13 y 18 d.p.c.) y la lactancia (7 y 14 d.p.p.) así como también de sus correspondientes controles vírgenes.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los ratones hembra IL-6 KO no gestantes presentan un menor depósito graso (abdominal y subcutáneo) que sus controles de genotipo salvaje, tal y como había sido previamente descrito por otros autores (205,586) para animales de la misma edad. El mismo resultado se observa cuando se analizan los pesos de ambos depósitos en valor absoluto (Fig.24A), así como al corregir estos valores por el peso corporal del animal (Fig.24B). Sin embargo, la gestación en todas sus fases (anabólica y catabólica) es capaz de revertir el efecto de la ausencia de IL-6 sobre el acúmulo de grasa abdominal (Fig.24B panel izquierdo), no habiendo diferencias en el contenido de la misma entre hembras gestantes de ambos genotipos en ninguno de los puntos temporales estudiados (7, 13 o 18 días p.c.). Coincidiendo con el bien establecido perfil de cambios en adiposidad durante la gestación (426), el contenido de grasa abdominal en los grupos de animales gestantes se eleva marcadamente respecto a sus controles vírgenes tanto a los 7 como a los 13 d.p.c. (fase anabólica de la gestación, Fig. 24C panel izquierdo). Curiosamente, a los 7 días de gestación la deficiencia de IL-6 parece favorecer un mayor depósito graso, siendo el porcentaje de aumento de este parámetro en hembras deficientes en IL-6 de un 52%, frente a un 19% en las hembras gestantes de genotipo salvaje (Fig. 24C panel izquierdo; $P<0.001$).

En la fase catabólica de la preñez (18 d.p.c.), etapa en la que el crecimiento fetal es más acusado y en la que tiene lugar la movilización de las reservas grasas para hacer frente a esta mayor demanda energética, se observa que mientras los ratones WT gestantes presentan ya un contenido de grasa abdominal similar al de sus controles vírgenes (Fig. 24 A y B panel izquierdo; en los ratones IL-6 KO gestantes se observa todavía un incremento de este depósito de un 18% respecto a sus controles no gestantes (Fig. 24C panel izquierdo).

El contenido de grasa subcutánea sufre, por el contrario, un aumento progresivo a lo largo de la gestación en ambos genotipos (Fig. 24 A y B, panel derecho). La ausencia de IL-6 parece favorecer un adelanto en la acumulación lipídica a este nivel, siendo ya evidente desde la mitad de la gestación en ratones IL-6 KO y alcanzando valores un 94% superior a los de sus controles no gestantes. Este mayor acúmulo no se apreciaba con la técnica de resonancia magnética (Fig. 23 A panel derecho). Es necesario tener en cuenta primero que, a los 13 y 18 días p.c. el tamaño del feto y la placenta contribuyen significativamente al incremento del peso corporal materno y, las correcciones por el peso materno en este caso, incluyen ambos factores.

Esta discordancia entre ambas técnicas puede deberse a la contribución del depósito graso subcutáneo, que se incrementa marcadamente en la última etapa de la gestación en ambos genotipos (Fig.24). De hecho, mediante disección sólo se cuantificaba el peso del depósito graso subcutáneo inguinal, mientras que la resonancia magnética permite medir la contribución de otros componentes de la reserva grasa subcutánea. Por tanto, la ausencia de IL-6 durante la gestación parece favorecer el aumento del depósito graso total durante la primera etapa de la misma, mientras que a partir de los 13 días p.c. comienzan a movilizarse las reservas grasas maternas en menor medida en los animales deficientes en IL-6, efecto que sólo se detecta a nivel del tejido graso abdominal.

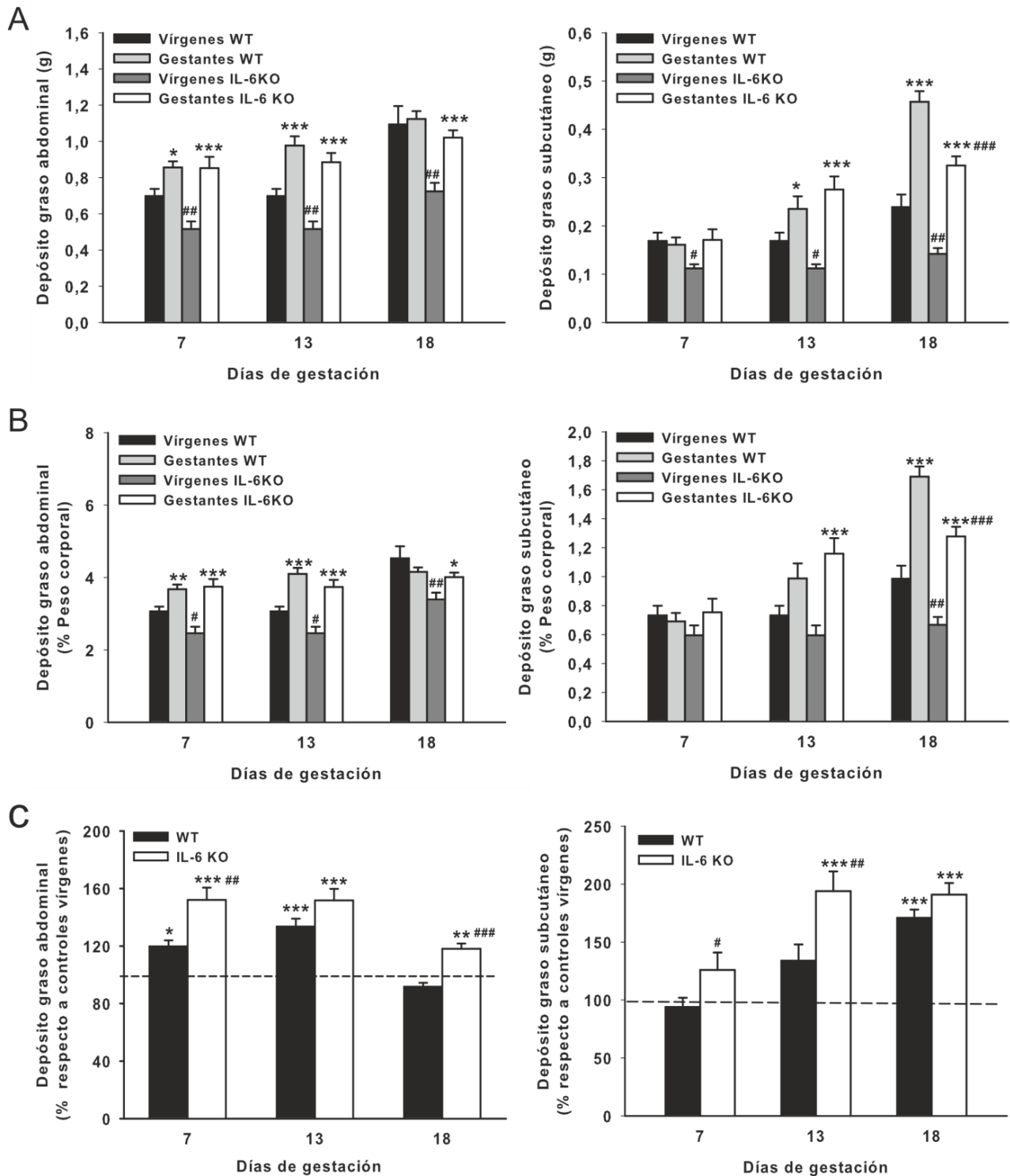


Figura 24. Depósito graso abdominal y subcutáneo de ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Peso fresco del depósito abdominal y subcutáneo (abdominal, panel de la izquierda; subcutáneo, panel de la derecha); B) Valores expresados en porcentaje de peso corporal (abdominal, panel izquierdo; subcutáneo, panel derecho) y C) Valores expresados en porcentaje respecto a los valores de los ratones control virgen de cada genotipo (abdominal, panel de la izquierda; subcutáneo, panel de la derecha). Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$; y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$, $n = 8-13$ animales/grupo. El valor del peso corporal excluye la contribución de los fetos y las placentas

Con el fin de evaluar cuál o cuáles eran los componentes del depósito graso abdominal responsables de las diferencias detectadas entre ambos genotipos durante la gestación éste fue dividido en depósito mesentérico, gonadal y retroperitoneal (587).

El análisis por disección de estos depósitos reveló que durante la primera mitad de gestación (7 y 13 días), todos ellos contribuyen de igual manera al incremento de adiposidad característico de la fase anabólica de este estado, mostrando en ambos genotipos un patrón de cambio similar al descrito previamente para el depósito graso abdominal (Fig. 24). Así, a los 7 días p.c., el incremento de los depósitos mesentérico y gonadal en ratones gestantes respecto a sus controles vírgenes es mayor en ausencia de IL-6, alcanzando aproximadamente un 69.97% por encima de los mismos, (Fig. 25 A y B).

Durante la última etapa de la gestación, (18 d.p.c.), en ratones WT gestantes, buena parte del contenido de grasa abdominal acumulado durante la etapa anabólica ha sido movilizado (Fig. 24). De tal manera que, mientras la masa de los depósitos mesentérico y retroperitoneal alcanzan los valores de los controles vírgenes, la cantidad de grasa gonadal se reduce significativamente por debajo de éstos. Por el contrario, en ratones deficientes en IL-6, los niveles de grasa mesentérica se encuentran todavía elevados respecto a sus controles vírgenes (Fig. 25 A).

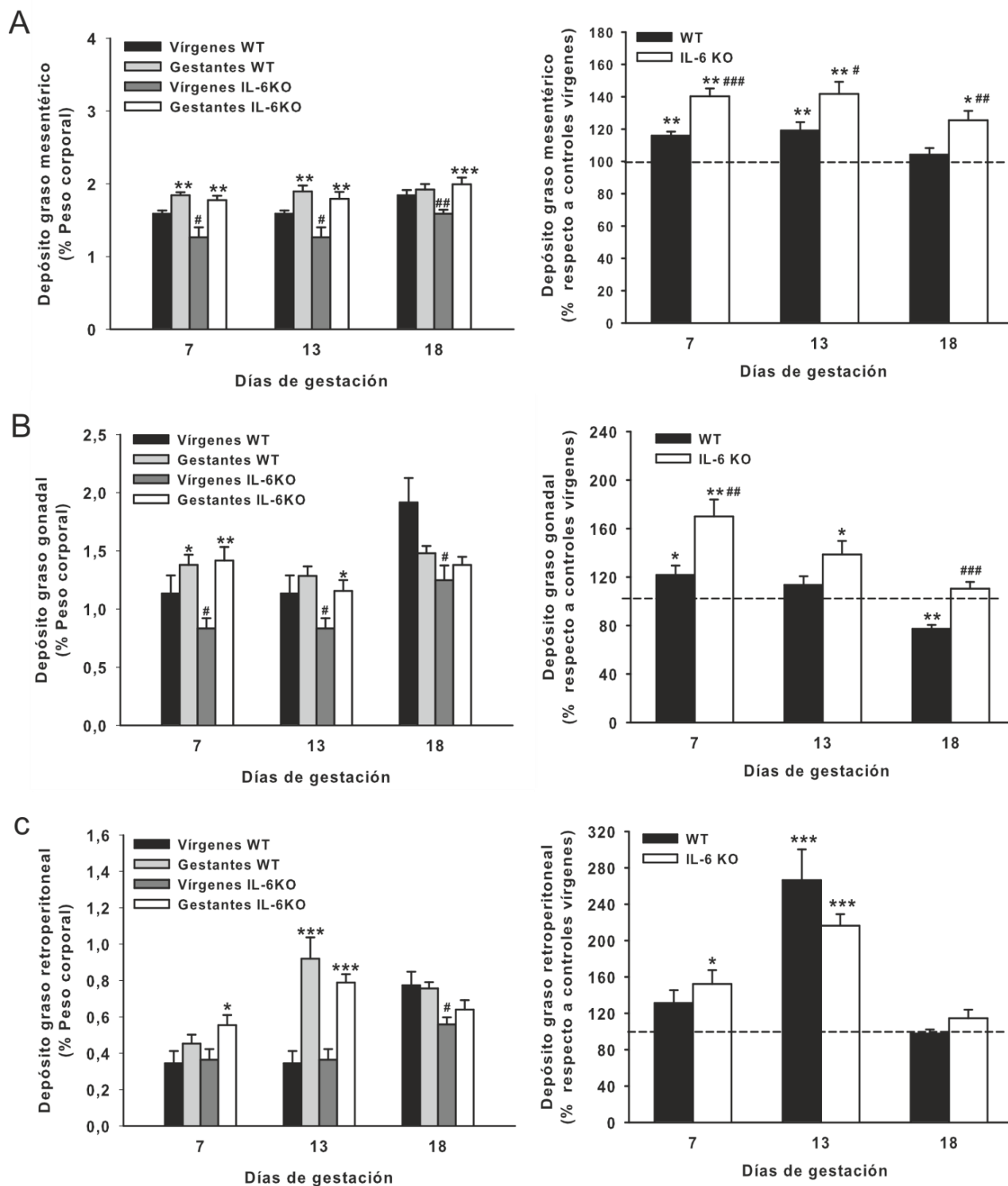


Figura 25. Distribución de depósitos grasos abdominales en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). El depósito graso abdominal fue separado en sus correspondientes componentes: A) mesentérico, B) gonadal y C) retroperitoneal. Panel izquierdo, valores expresados en porcentaje de peso corporal y, panel derecho, en porcentaje respecto a los valores de los ratones control virgen de cada genotipo. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$; y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$, $n = 8-13$ animales/grupo. El valor del peso corporal excluye la contribución de los fetos y las placentas.

Otra de las adaptaciones metabólicas de este estado fisiológico es el incremento progresivo de la síntesis de lípidos a nivel hepático que se traduce en un aumento del tamaño de este órgano y en la característica hipertrigliceridemia materna del final de la gestación (426). Dado que IL-6 se ha postulado como un modulador del desarrollo de este órgano en la etapa adulta en el ratón (588) y que además existen múltiples datos en bibliografía acerca de las acciones de esta citoquina sobre el metabolismo hepático (véase apartado 2.3.4.2 de la introducción), decidimos analizar su efecto sobre el proceso de hipertrofia de este órgano durante la segunda mitad de la gestación. Tal y como se recoge en la tabla 6, el peso fresco del hígado se encuentra significativamente reducido en los animales vírgenes deficientes en IL-6 respecto a sus controles WT. Las alteraciones metabólicas de la gestación inducen un marcado incremento en el tamaño de este órgano en ambos genotipos, siendo este similar en ratones WT e IL-6 KO tanto a los 13 como a los 18 días p.c. tanto en valor absoluto como corregido por el peso corporal. Sin embargo, el aumento del peso hepático en animales gestantes respecto a vírgenes es superior en ausencia de IL-6 a los 13 días de gestación ($P=0.01$).

	Vírgenes (n=8-13)		Gestantes 13 días (n=8-13)		Vírgenes (n=8-13)		Gestantes 18 días (n=8-13)	
	WT	IL-6KO	WT	IL-6KO	WT	IL-6KO	WT	IL-6KO
Peso neto(g)	1.12±0.03	0.91±0.05##	1.59±0.12***	1.62±0.05***	1.03±0.04	0.85±0.02#	1.67±0.05***	1.50±0.12***
Peso (% peso corporal)	4.95±0.13	4.34±0.22#	6.71±0.50**	6.88±0.245***	4.32±0.11	4.00±0.10	6.20±0.23	5.88±0.42
Peso (% respecto a virgen)	100±2.09	100±5.71	133.36±7.19	158.57±5.65*** [#]	100±2.10	100±1.54	163.99±1.76***	163.42±7.29***

Tabla 3. Peso del hígado en ratones WT e IL-6 KO vírgenes y gestantes de 13 y 18 días. Valores expresados en gramos, en % respecto al peso corporal y en % respecto a ratones control virgen. Nivel de significación respecto a controles vírgenes ** $P<0.01$, * $P<0.001$ y respecto a controles WT en el mismo estado reproductivo # $P<0.05$, ## $P<0.01$; n= 8-13 animales/grupo.**

La lactancia, al igual que la gestación, se caracteriza por un marcado aumento de las demandas energéticas maternas. En este contexto el tejido adiposo contribuye a las adaptaciones homeorréticas que tienen lugar en este periodo mediante la movilización de las reservas grasas acumuladas durante la gestación, que serán derivadas a la glándula mamaria para la lactogénesis. Por ello, en un segundo experimento, analizamos

el efecto de la ausencia de IL-6 sobre la acumulación de reservas grasas a lo largo de las dos primeras semanas post parto.

Los datos obtenidos indican que, al igual que ocurría en el análisis de composición corporal durante la gestación los ratones vírgenes IL-6 KO presentan un menor contenido de depósito graso abdominal y subcutáneo que sus controles de genotipo salvaje (Fig. 26). A pesar de ello, esta diferencia que se anulaba durante la gestación, desaparece también durante la lactancia; de tal manera que el contenido de grasa abdominal y subcutánea es similar en hembras lactantes de ambos genotipos, tanto a los 7 como a los 14 días post parto (Fig. 26). Si a los 18 días p.c. los ratones WT habían movilizado buena parte del exceso de grasa abdominal (Fig. 26 panel izquierdo) acumulado durante la fase anabólica de la gestación, transcurridos 7 días de lactancia el contenido de este depósito en los ratones WT es similar al de sus controles vírgenes, tanto en valor absoluto como relativo a su peso corporal (Fig. 26A y B panel izquierdo), para luego descender marcadamente a los 14 días post parto (Fig. 26C). Por el contrario, los ratones deficientes en IL-6, que a los 18 d.p.c. todavía retenían parte de la grasa abdominal acumulada durante la gestación, no muestran cambios en el contenido de grasa abdominal durante la lactancia (Fig. 26A y B panel izquierdo). Estos resultados sugieren que la ausencia de IL-6 podría estar bloqueando la movilización lipídica característica de este estado (Fig. 26C panel izquierdo).

El depósito graso subcutáneo inguinal, a diferencia de la grasa abdominal, se incrementa drásticamente durante la lactancia, siendo este efecto ya evidente desde los 7 días post parto (Fig. 26A y B panel derecho) en ambos genotipos. A los 14 días de lactancia, aunque no existen diferencias en el peso de este depósito entre genotipos, tanto en valor absoluto como relativo al peso corporal, su incremento respecto a los valores observados en controles vírgenes, es más marcado en ausencia de IL-6 (incremento respecto a vírgenes control: WT= 250% vs IL-6 KO= 380%; Fig. 26C panel derecho).

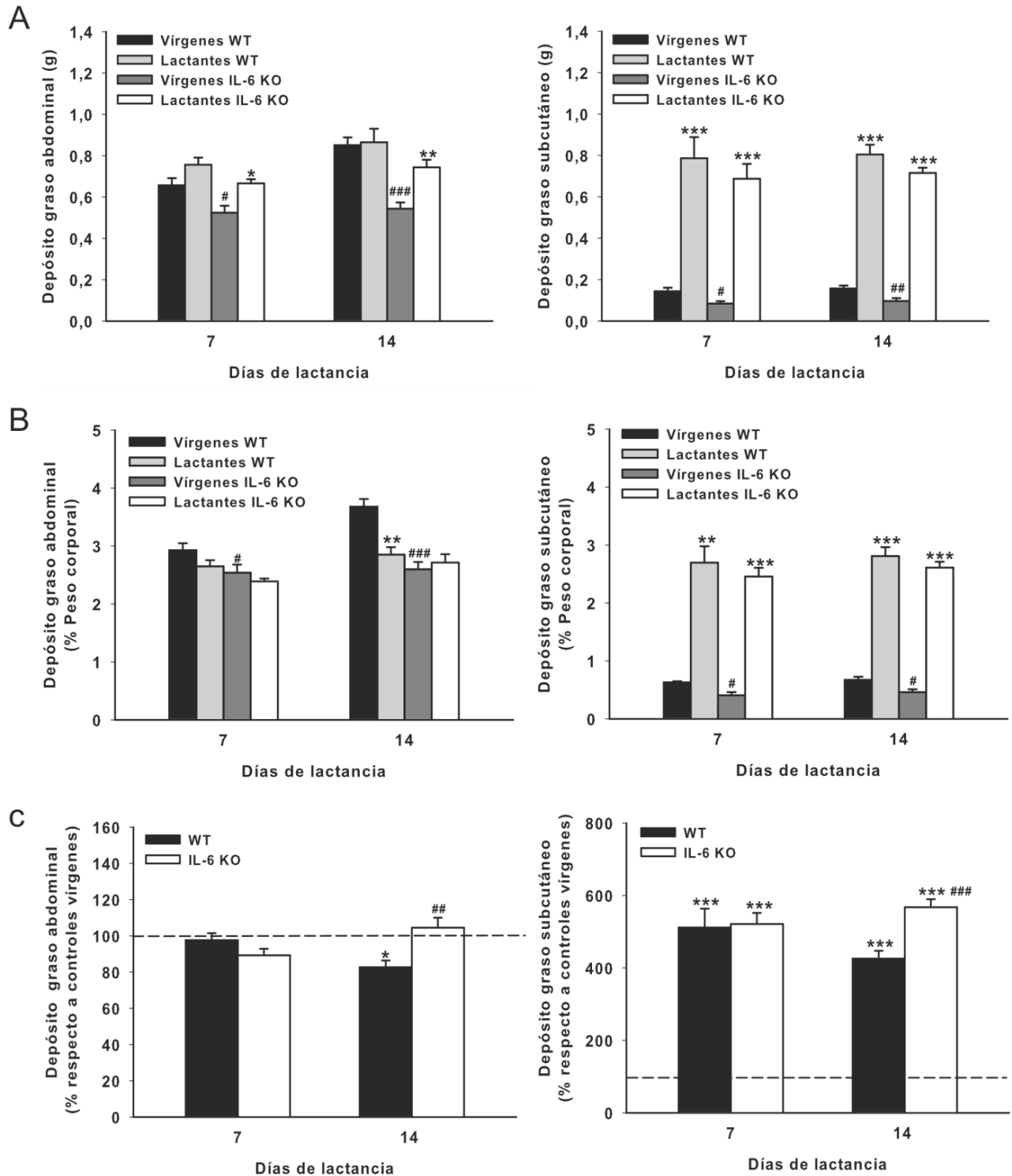


Figura 26. Depósito graso abdominal y subcutáneo de ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Peso fresco del depósito abdominal y subcutáneo (abdominal, panel de la izquierda; subcutáneo, panel de la derecha); B) valores expresados en porcentaje de peso corporal (abdominal, panel izquierdo; subcutáneo, panel derecho) y C) en porcentaje respecto a los valores de los ratones control virgen de cada genotipo (abdominal, panel de la izquierda; subcutáneo, panel de la derecha). Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$; y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$, $n = 8-15$ animales/grupo.

Por último los distintos depósitos que conforman la grasa abdominal permanecen relativamente estables durante la primera semana de lactancia (Fig.27). Sin embargo transcurridos 14 días desde el parto, se observan significativas reducciones en el contenido de grasa mesentérica, gonadal y retroperitoneal (11%, 30% y 42%; respectivamente) en los ratones WT lactantes respecto a sus controles vírgenes. Por el contrario la deficiencia de IL-6 durante la lactancia no produce efecto alguno sobre ninguno de estos depósitos (Fig.27).

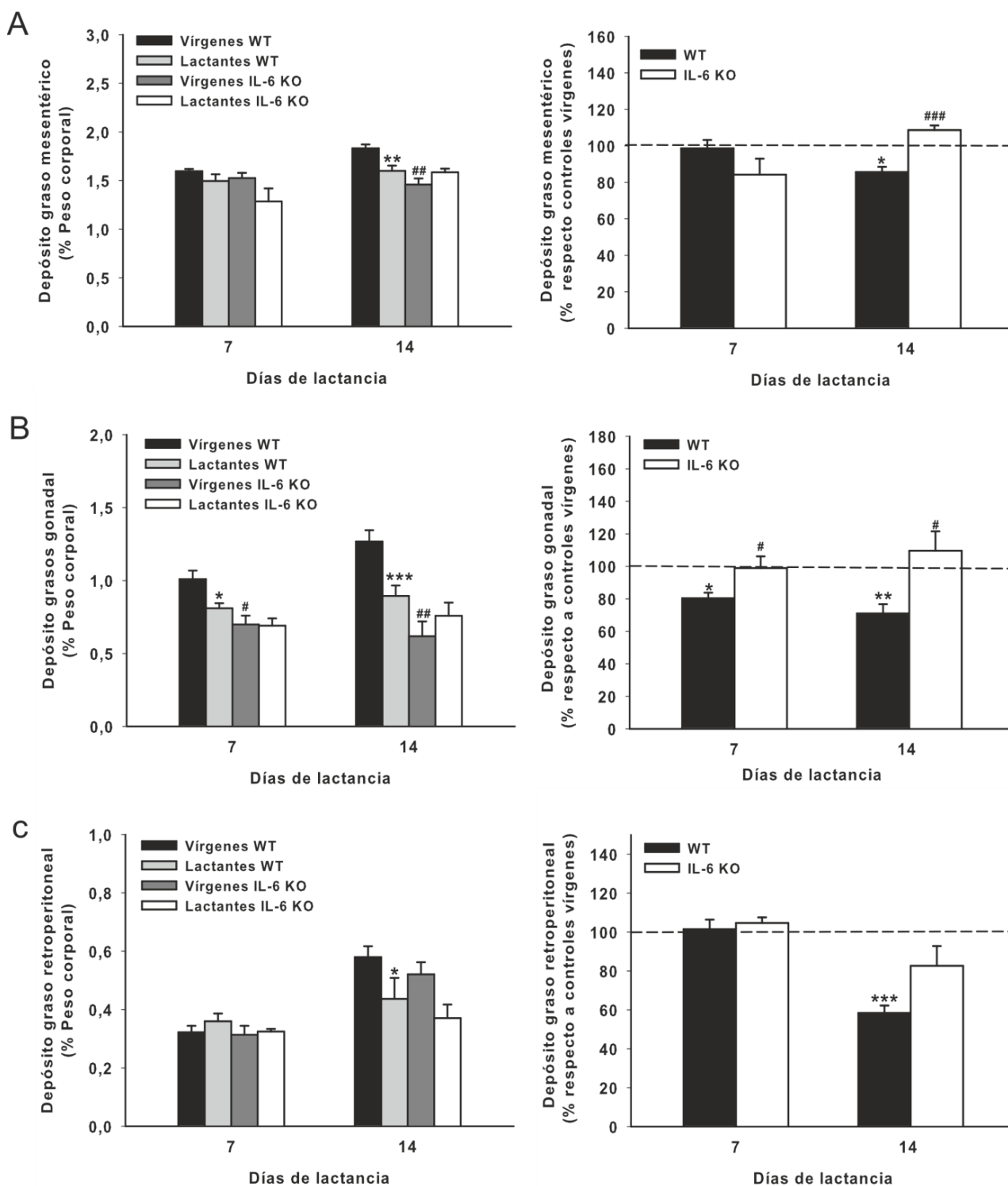


Figura 27. Distribución de depósitos grasos abdominales en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7y 14 días p.p.). El depósito graso abdominal fue separado en sus correspondientes componentes: A) mesentérico, B) gonadal y C) retroperitoneal. Panel izquierdo, valores expresados en porcentaje de peso corporal y, panel derecho, en porcentaje respecto a los valores de los ratones control virgen de cada genotipo. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$; y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$, $n = 8-15$ animales/grupo. El valor del peso corporal excluye la contribución de los fetos y las placentas.

Muchas de las alteraciones metabólicas que se inician al final de la gestación a nivel hepático, se prolongan a lo largo de la lactancia dando lugar a un aumento todavía mayor del tamaño de este órgano en este estado. De hecho, junto con la glándula mamaria el hígado es el principal órgano con capacidad lipogénica durante este periodo. A pesar de que los datos obtenidos respecto al peso fresco del hígado indican que éste prácticamente se duplica durante la lactancia en ambos genotipos (Tabla 7), no hemos podido detectar efecto alguno de IL-6 sobre el grado de crecimiento de este tejido en ninguno de los puntos temporales analizados.

	Vírgenes (n=8-15)		Lactantes 7 días (n=8-15)		Vírgenes (n=8-15)		Lactantes 14 días (n=8-15)	
	WT	IL-6KO	WT	IL-6KO	WT	IL-6KO	WT	IL-6KO
Peso neto(g)	1.13±0.02	1.13±0.04	2.08±0.05***	2.00±0.06***	1.29±0.03	0.85±0.02##	2.15±0.03***	2.01±0.05***
Peso (%peso corporal)	5.16±0.12	5.51±0.14	7.31±0.12***	7.22±0.16***	5.69±0.12	5.57±0.08	7.55±0.11***	7.30±0.13***
Peso(% respecto a control virgen)	100±1.08	100±2.54	141.54±2.29***	131.02±3.03*** #	100±2.22	100±1.44	132.62±1.92***	131.14±2.44***

Tabla 4. Peso fresco del hígado en ratones WT e IL-6 KO vírgenes y lactantes de 7 y 14 días. Valores expresados en gramos, en % respecto al peso corporal y en % respecto a ratones control virgen. Nivel de significación respecto a controles vírgenes *P<0.001 y respecto a controles WT en el mismo estado reproductivo #<0.05, ##P<0.01; n=8-15 animales/grupo.**

2. INGESTA

El progresivo incremento de la ingesta durante la gestación y la lactancia supone una de las principales adaptaciones de la homeostasis energética en ambos estados fisiológicos y su evolución, ha sido ampliamente descrita en numerosos estudios tanto en humanos como en roedores (véase apartado 5.1 de la introducción). Por ello y teniendo en cuenta la mayor tasa de adiposidad observada en animales deficientes en IL-6 durante el ciclo reproductivo, nos planteamos estudiar el posible efecto de esta citoquina sobre el patrón de ingesta característico de la gestación y la lactancia. Para ello, hemos determinado los niveles de ingesta diaria promedio en cinco franjas temporales comprendidas entre los días 0-7, 7-13 y 13-18 de gestación y, entre los días 0-7 y 7-14 de lactancia en ratones WT e IL-6 KO de 12 semanas de edad.

Originariamente, las hembras deficientes en IL-6 presentan una tasa de ingesta significativamente inferior a las de sus controles de genotipo salvaje (WT vírgenes=3.59 $\pm$ 0.1g vs. IL-6 KO vírgenes: 3.413 $\pm$ 0.04g; P<0.05), aunque este efecto desaparece al corregir estos valores por el peso corporal del animal (Fig.27B). Tal y como previamente había sido descrito por diversos autores (589), nuestros datos indican que la tasa de ingesta incrementa progresivamente durante la gestación en el ratón, aunque en nuestro estudio este incremento es ya significativo a partir de la primera semana de la misma, alcanzando en la gestación a término valores un 40% superiores a los observados en los controles no gestantes (Fig.28A).

Sin embargo aunque durante la primera semana de gestación la ausencia de IL-6 parece no afectar la tasa de ingesta, puesto que la cantidad de comida ingerida es similar en hembras gestantes de ambos genotipos, al corregir estos valores por el peso corporal se observa un ligero pero significativo incremento de la misma en los ratones IL-6 KO respecto a sus controles WT gestantes (Fig.28B). Posteriormente, durante la gestación intermedia (7-13 d.p.c.) y a término (13-18 d.p.c.) aunque los ratones deficientes en IL-6 desarrollan la hiperfagia característica de esta etapa, sus niveles de ingesta son significativamente inferiores a los observados en los ratones WT gestantes (WT G13D= 3,99 $\pm$ 0,09 g vs IL-6 KO G13D: 3.51 $\pm$ 0.11 g; P<0.01 y WT G18D= 5.31g $\pm$ 0.11g vs IL-6 KO G18D= 4.51 $\pm$ 0.15 g; P<0.001) (Fig. 27A). Sin embargo, cuando se corrigen los valores de ingesta por el valor de peso corporal las diferencias entre genotipos en esta etapa desaparecen (Fig. 28B).

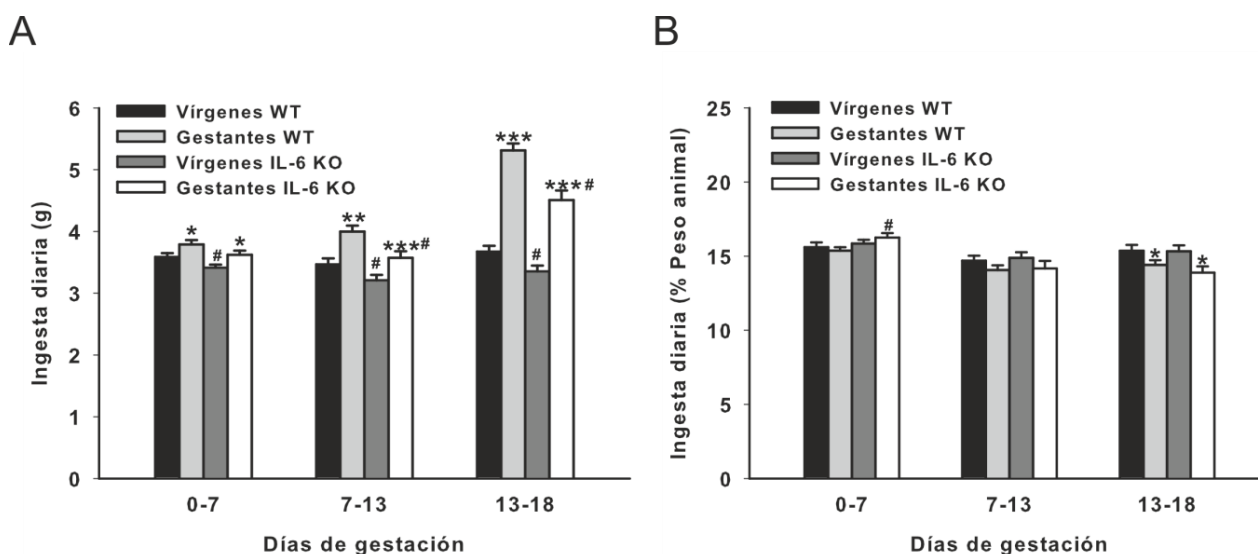
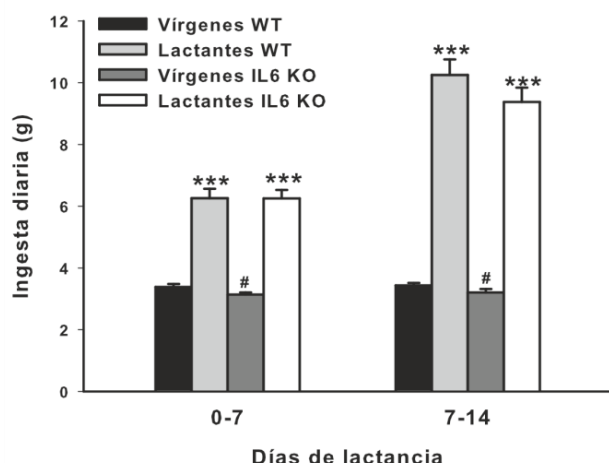


Figura 28. Evolución de la tasa de ingesta en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación temprana (0-7 días p.c.), intermedia (7-13 días p.c.), y a término (13-18 días p.c.). A) Ingesta diaria promedio. B) Ingesta diaria promedio corregida por peso corporal. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P<0.05$, ** $P<0.01$ y *** $P<0.001$; y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P<0.05$, $n=15-21$ animales/grupo. El valor del peso corporal excluye la contribución de los fetos y las placentas.

A continuación realizamos un estudio similar en el que se evaluó el patrón de ingesta durante la lactancia, al igual que ocurría en el caso de la gestación, los ratones control deficientes en IL-6 presentaban una menor ingesta diaria que los controles de genotipo salvaje tanto durante la primera como durante la segunda semana del experimento (WT vírgenes; 3.43 ± 0.08 vs. IL-6 KO vírgenes: 3.20 ± 0.08 , $P<0.05$).

Durante la lactancia la ausencia de IL-6 parece no afectar a la hiperfagia característica de este estado puesto que, la media de ingesta diaria es similar en ambos genotipos mostrándose aumentada del mismo modo respecto a sus respectivos controles vírgenes durante los siete días posteriores al parto así como también en la lactancia intermedia (7-14 días p.p.; Fig. 29).

A



B

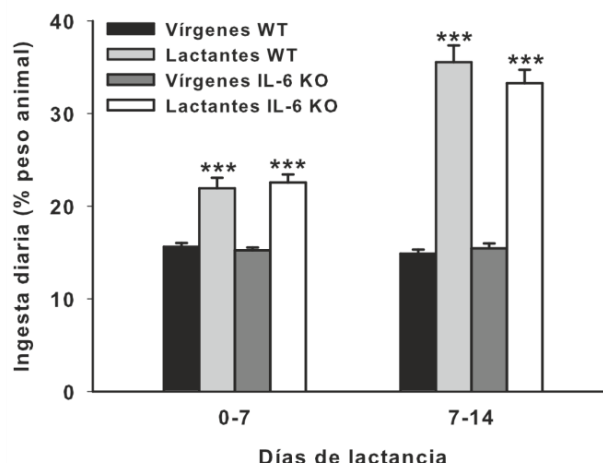


Figura 29. Evolución de la tasa de ingesta en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia temprana (0-7 días p.p.) e intermedia (7-14 días p.p.) A) Ingesta diaria. B) Ingesta diaria corregida por peso corporal. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen *** $P < 0.001$; y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, $n = 12-15$ animales/grupo.

En resumen, estos resultados indican que durante la gestación temprana el aumento de la ingesta observado en ausencia de IL-6, podría contribuir al mayor depósito de grasa observado durante esta etapa en los animales deficientes en esta citoquina. Por el contrario, la ausencia de cambios en el patrón de ingesta entre ambos genotipos tanto durante la gestación intermedia y a término como durante la lactancia, sugiere que el mayor acúmulo de grasa observado en las hembras deficientes en IL-6 podría estar relacionado con una posible alteración en el gasto energético de estos animales.

3. PERFIL BIOQUÍMICO BASAL DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA

A continuación, y con fin de determinar la posible existencia de un metabolismo lipídico e hidrocarbonado alterado en las hembras deficientes en IL-6 durante la gestación y la lactancia se determinaron los niveles séricos de glucosa, triglicéridos y colesterol en nuestro modelo.

A pesar de que en la rata, está ampliamente descrito que durante la última etapa de la gestación y como consecuencia del aporte de glucosa al feto, se reducen significativamente los niveles séricos de este sustrato; en nuestro estudio no hemos sido capaces de observar diferencias en sus niveles a lo largo de este estado fisiológico (7,13 y 18 días) en ratones WT gestantes respecto a sus controles vírgenes. Sin embargo, si hemos observado a una marcada reducción de los niveles de glucosa en suero de ratones IL-6 KO respecto a sus controles vírgenes a los 13 y a los 18 días de gestación respectivamente (Fig. 30A panel izquierdo). Por el contrario durante la lactancia este descenso se observa en ambos genotipos tanto a los 7 como a los 14 días p.p. (Fig. 30A panel derecho).

La ausencia de IL-6 en el ratón parece no afectar al metabolismo del colesterol durante la gestación, dado que no hay diferencias en sus niveles séricos entre las hembras gestantes de genotipo salvaje y las deficientes en IL-6. De tal manera que hemos detectado en ambos genotipos un marcado descenso en su concentración en suero, a partir de los 13 días p.c. más marcado si cabe a los 18 d.p.c. (Fig.30B panel izquierdo). De acuerdo a lo descrito previamente por otros autores (590), la lactancia se caracteriza por el desarrollo de hipercolesterolemia (Fig. 30B panel derecho), no observándose diferencias entre las hembras de genotipo salvaje y las deficientes en IL-6 en ninguno de los puntos temporales estudiados.

Finalmente, y en contra de lo esperado, dada existencia de múltiples referencias en la bibliografía indicando que la gestación a término está caracterizada por una marcada hipertrigliceridemia, no hemos detectado una elevación significativa en los niveles de triglicéridos en animales gestantes WT ni IL-6 KO a los 18 d.p.c. Curiosamente en estos últimos se observa un significativo incremento de los mismos a los 13 días p.c. tanto respecto a sus controles vírgenes como a los correspondientes controles WT gestantes (Fig. 30C panel izquierdo). Posteriormente durante la lactancia no hemos encontrado ningún efecto ni del estado reproductivo ni de la ausencia de IL-6 sobre este parámetro (Fig. 30C panel derecho).

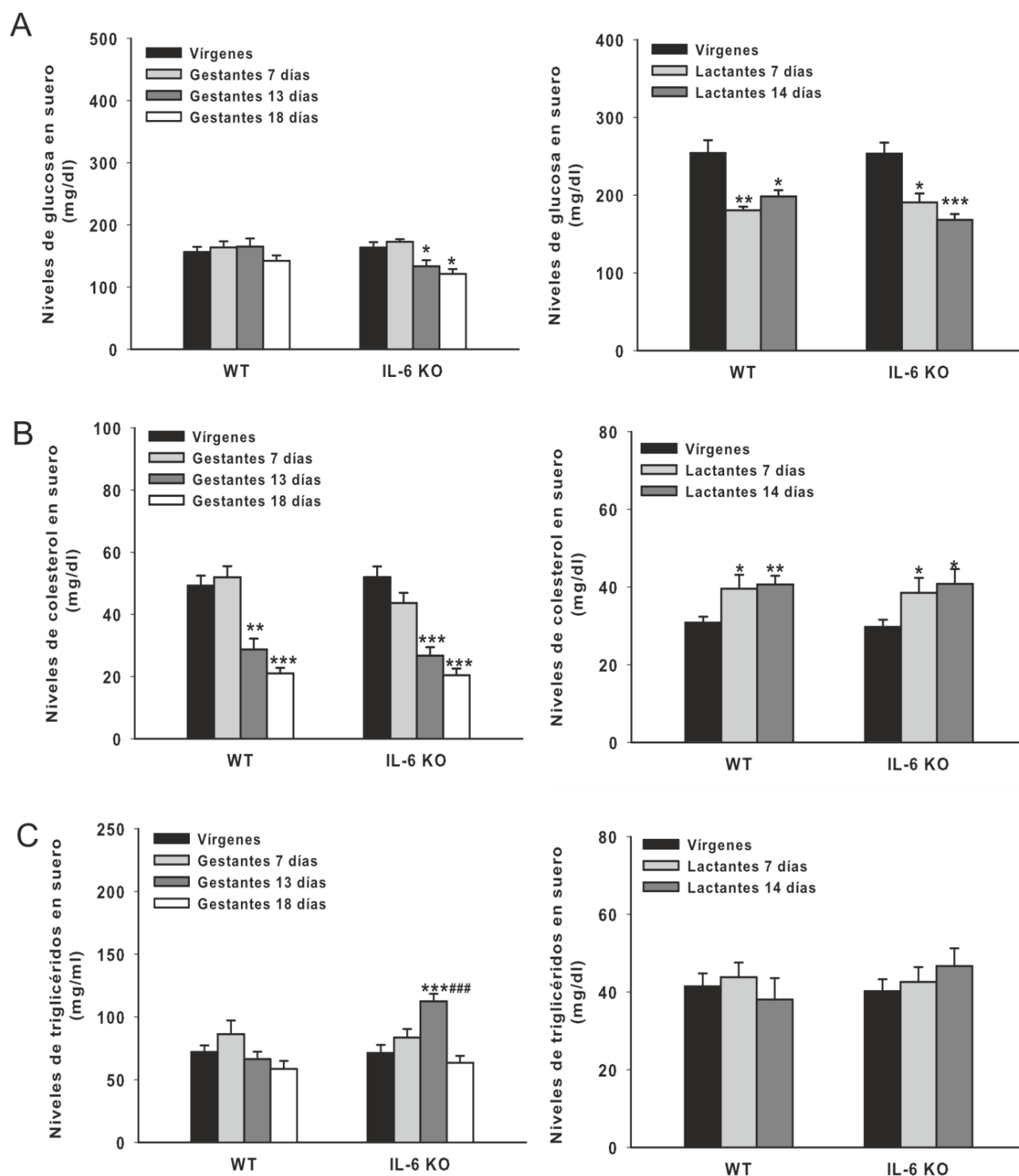


Figura 30. Perfil bioquímico basal en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7,13 y 18 días p.c. panel izquierdo) y la lactancia (7 y 14 días p.p., panel derecho). A) Glucosa, B) Colesterol y C) Triglicéridos. Valores expresados en mg/dl. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$; y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo #### $P < 0.001$, $n = 8-15$ animales/grupo.

1. PERFIL DE EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE IL-6 Y SU RECEPTOR IL-6R α DURANTE LA GESTACIÓN

En vista de las diferencias existentes entre genotipos en el perfil de depósito de grasa durante la gestación y la lactancia, y las evidencias experimentales que sugieren un posible papel de IL-6 como modulador de la ingesta, el gasto energético y la adiposidad a nivel central (157,158,252,591), nos planteamos estudiar la evolución a lo largo de ambos estados fisiológicos de los niveles de ARNm hipotalámico de esta citoquina y la subunidad alfa de su receptor (IL-6R α), responsable de la unión específica de IL-6 al receptor heterodimérico que constituye junto con gp130.

Aunque no se observaron cambios en los niveles hipotalámicos de ARNm de IL-6 durante ninguna de las etapas de la gestación ni de la lactancia (Fig. 31 y 32 A), los resultados obtenidos indican que la expresión de IL-6R α es modulada específicamente a lo largo del ciclo reproductivo (Fig. 31 y 32 B). Así, el contenido hipotalámico de su ARNm disminuye significativamente en la primera semana de gestación (7 días p.c.), al tiempo que comienza a observarse un incremento en la ingesta y en el depósito de grasa materna, para luego recuperar los niveles observados en los ratones control vírgenes al inicio de la etapa catabólica (13 días p.c.), y reducirse de nuevo hasta aproximadamente un 70% de estos valores en la gestación a término (Fig. 31 B). Puesto que en la última etapa de la gestación se produce un incremento de la producción periférica (tejido adiposo y placenta) de IL-6 (435,592), que resulta en una elevación de los niveles plasmáticos de esta citoquina (83), decidimos analizar el impacto de la deficiencia de IL-6 sobre la expresión hipotalámica de su receptor durante este periodo. Nuestros resultados indican que, tal y como se puede observar en la Fig. 31C, en ausencia de producción endógena de esta citoquina se produce una reducción en la expresión de IL-6R α . Sin embargo, los valores observados en animales IL-6 KO vírgenes son semejantes a los presentes en el grupo WT gestante, no habiendo diferencias entre animales gestantes de ambos genotipos. Estos datos sugieren que los elevados niveles periféricos de IL-6 en la última etapa de la gestación no alcanzan el SNC, por lo que otro factor o factores podrían ser los responsables de la inhibición observada en la expresión hipotalámica de su receptor durante este periodo.

Por el contrario, siete días tras el parto los niveles de ARNm de IL-6R α en el hipotálamo de los ratones hembra lactantes, son semejantes a los observados en sus

controles vírgenes, para luego disminuir significativamente a los 14 días de lactancia, coincidiendo con el momento en que se alcanza la máxima tasa de ingesta y de movilización de las reservas grasas de la madre lactante (Fig. 32C). Finalmente, y de manera similar a lo observado en la gestación a término, no se detectaron diferencias entre animales lactantes de ambos genotipos.

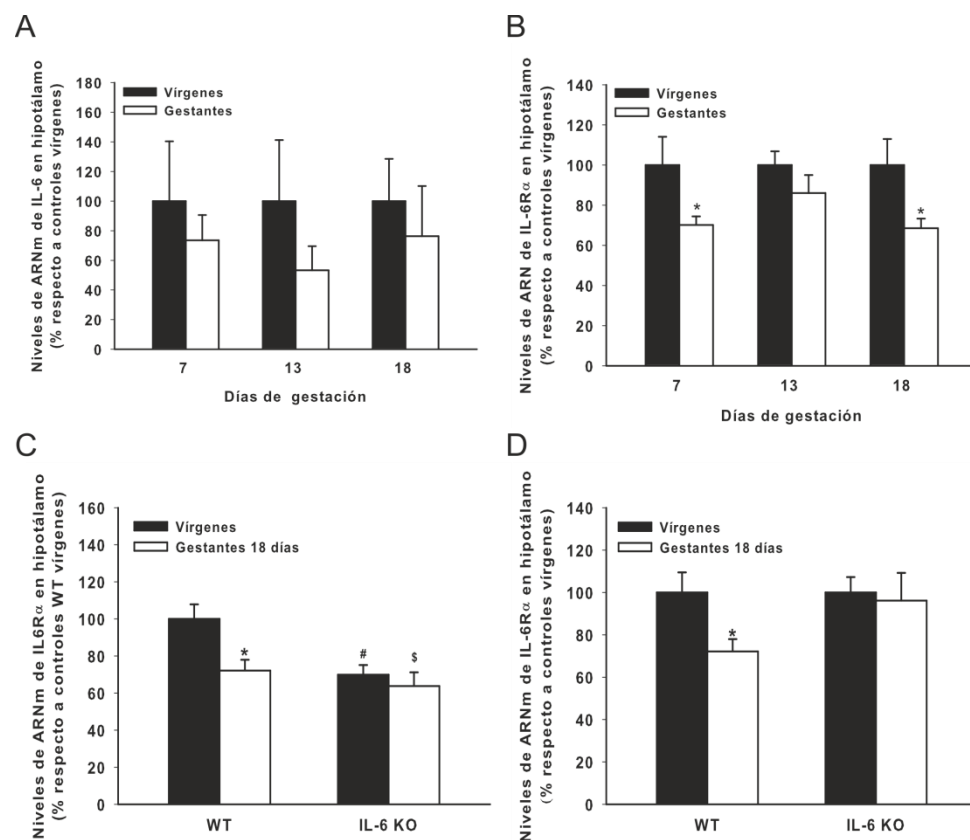


Figura 31. Niveles de ARNm de IL-6 y B) de IL-6Rα en ratones WT durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). Niveles de ARNm de IL-6Rα a los 18 días de gestación en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO), C) valores respecto a controles WT vírgenes y D) valores respecto a controles vírgenes de cada genotipo. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen *P<0.05, respecto a control virgen WT \$ P<0.05 y respecto a controles WT del mismo estado reproductivo # P<0.05; n=6-8 animales/grupo.

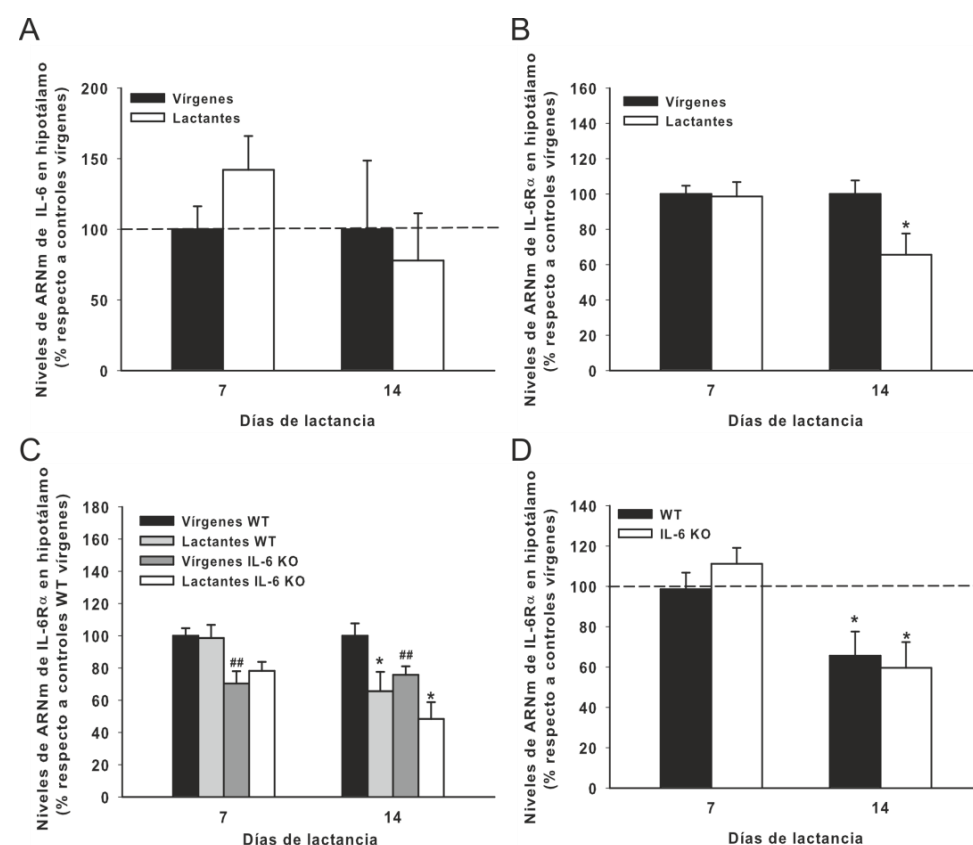


Figura 32. Niveles de ARNm de IL-6 y B) de IL-6Rα en ratones WT durante la lactancia (7 y 14 días p.c.). Niveles de ARNm de IL-6Rα a los 7 y 14 días de lactancia en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO), C) valores respecto a controles WT vírgenes y D) valores respecto a controles vírgenes de cada genotipo. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen *P<0.05; y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo ##P<0.01; n=6 animales/grupo.

5. INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 SOBRE LOS CIRCUITOS CENTRALES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO

La homeostasis energética es controlada por complejas redes neuronales productoras de una amplia variedad de neuropéptidos y neurotransmisores que, a pesar de localizarse en distintos núcleos hipotalámicos, están interconectados entre sí y se encuentran bajo la influencia de señales metabólicas y endocrinas producidas por distintos órganos periféricos, como el tejido adiposo, el músculo esquelético, el hígado y el páncreas. En condiciones basales, se establece un balance dinámico entre la producción de neuropéptidos catabólicos, como POMC, CRH y TRH..., que inhiben la ingesta, estimulan el gasto energético y promueven la disminución de reservas grasas; y anabólicos, como NPY y AgRP..., que estimulan la ingesta, reducen el gasto energético, y favorecen el acúmulo lipídico. Durante la gestación y la lactancia, y en respuesta a las distintas alteraciones hormonales que tienen lugar en el organismo materno, se producen profundas adaptaciones en esta señalización central que favorecen no sólo el desarrollo de hiperfagia, sino también de cambios en el gasto energético y en la utilización de sustratos por los tejidos periféricos, que resultan en último término en un ajuste tanto del peso como de la composición corporal. Por consiguiente, y con el fin de determinar el posible papel de IL-6 en la regulación del balance energético a nivel central en ambos estados fisiológicos, se estudiaron mediante hibridación *in situ* los niveles de ARNm de los principales neuropéptidos implicados en este complejo sistema de control a nivel de los núcleos hipotalámicos ARC (NPY, AgRP, y POMC), PV (CRH, y TRH) y el área HL (MCH, y Prepro-OX) en ratones WT e IL-6 KO durante la gestación y la lactancia, así como también en sus correspondientes controles vírgenes.

Con el fin de simplificar la exposición de los resultados, se comentarán inicialmente los datos referentes a la gestación, para luego describir los correspondientes a la lactancia.

Con respecto al núcleo ARC hipotalámico, nuestros resultados indican que la gestación en el ratón, a diferencia de lo que ocurre en la rata (422,436,460), no afecta a la expresión de NPY ni de AgRP. De esta manera, el contenido de ARNm de ambos neuropéptidos es similar entre ratones WT gestantes y sus controles vírgenes en todos los puntos temporales estudiados (Fig. 33 A y B). Por el contrario, a partir de la segunda semana de gestación se observa una significativa reducción de la expresión de POMC

en este núcleo (aproximadamente un 50% de los valores en los ratones WT vírgenes), que se mantiene hasta los días previos al parto (Fig.33C). Curiosamente aunque la ausencia de IL-6 endógena no afecta a la expresión de ninguno de los neuropéptidos estudiados en este núcleo, si observamos un efecto estimulador de la gestación y de la deficiencia de esta citoquina sobre los niveles de ARNm de AgRP, evidente únicamente a los 18 días p.c. (porcentaje respecto a los niveles en ratones WT vírgenes: Gestantes IL-6 KO= $137.70 \pm 11.21\%$; $P < 0.01$; vs IL-6 KO vírgenes; Fig. 33B, panel izquierdo). Además, en este periodo de la gestación, la expresión tanto de NPY como de POMC incrementa entre un 40 y un 50%, respectivamente, en los ratones IL-6 KO gestantes respecto a sus controles WT en el mismo estado reproductivo (Fig. 33. A y C panel izquierdo).

Por otro lado, cuando los resultados son analizados en relación a los controles vírgenes correspondientes en cada genotipo, se observa que en animales deficientes en IL-6 ya desde los 13 días p.c. se incrementa la producción hipotalámica de NPY y AgRP (Fig.33 A y B panel derecho). Sin embargo, la inhibición de la expresión de POMC, característica de los dos últimos tercios de la gestación, es revertida por completo por la ausencia de esta citoquina (Fig.33 C). De tal manera que los niveles de ARNm de este neuropéptido en ratones IL-6 KO gestantes son similares a los presentes en los ratones vírgenes del mismo genotipo. En resumen, el efecto estimulador de la deficiencia de IL-6 sobre la expresión de los péptidos anabólicos NPY y AgRP en el núcleo ARC durante la última fase de la gestación, favorece en nuestro modelo, el mantenimiento de la hiperfagia característica de este estado reproductivo, compensando en cierta medida la ausencia de modulación de la expresión de POMC observada en animales de genotipo salvaje.

Con respecto al núcleo PV, datos previos del grupo del prof. Jansson (251) indican que el fenotipo obeso característico de los ratones IL-6 KO en la madurez, está asociado a una inhibición de la expresión de distintos neuropéptidos implicados en la regulación del balance energético a nivel de este núcleo, como por ejemplo: CRH, AVP y oxitocina. Además, IL-6R α se expresa abundantemente en las neuronas productoras de CRH, AVP, oxitocina y TRH, sugiriendo que IL-6 podría estimular la expresión de estos neuropéptidos directamente a nivel de este núcleo. Por tanto, en este trabajo se ha analizado la evolución temporal de los niveles de ARNm de los neuropéptidos inhibidores de la ingesta y estimuladores del gasto energético, CRH y TRH.

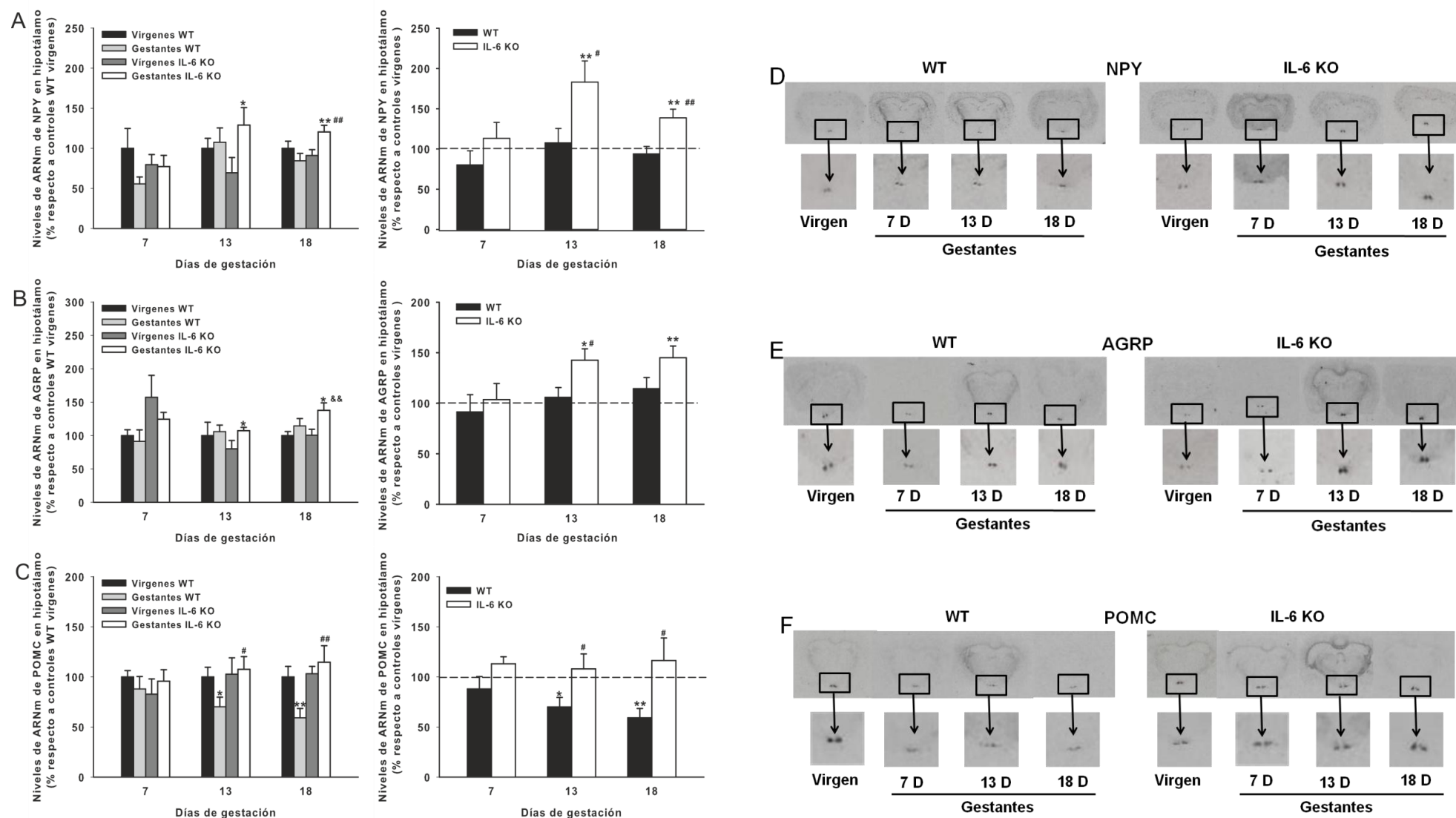


Figura 33. Niveles de ARNm de NPY (A), AGRP (B) y POMC (C) en el núcleo ARC hipotalámico de ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). Panel izquierdo) Valores respecto a control WT virgen. Panel derecho) Valores respecto a vírgenes correspondientes. D-F) Imágenes autorradiográficas representativas de cada grupo experimental. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo ## $P < 0.01$ y respecto a animales WT virgen && $P < 0.01$. NPY, $n = 7-12$ animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y $n = 14-16$ animales/grupo para gestantes 18 días. AGRP, $n = 7-8$ animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y $n = 15-16$ animales/grupo para gestantes 18 días. POMC; $n = 5-8$ animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y $n = 7-8$ animales/grupo para gestantes 18 días.

En cuanto a CRH, a pesar de que se ha descrito una disminución de su expresión en el NPV de ratones IL-6 KO una vez que han desarrollado el fenotipo obeso, en este caso (ratones hembra de 12-15 semanas de edad) no hemos detectado diferencias en la producción de este neuropéptido entre genotipos. A lo largo de la mayor parte de la gestación, pero también durante la lactancia, la actividad basal del eje HHA está reducida, reflejando principalmente una disminución de la actividad de las neuronas productoras de CRH y AVP en la región parvocelular del núcleo PV (471). De acuerdo con este hecho los resultados obtenidos demuestran que los niveles de ARNm de CRH en esta región hipotalámica, se mantienen significativamente reducidos a lo largo de toda la gestación, siendo esta inhibición similar en ambos genotipos (Fig. 34).

Con respecto a TRH nuestros datos indican que, aunque durante primera semana de gestación no se observan cambios en su expresión en el núcleo PV, ésta incrementa aproximadamente un 50 % al inicio de la fase catabólica (13 d.p.c.; porcentaje respecto a los niveles en ratones WT vírgenes: Gestantes WT= $151.53 \pm 14.9\%$, $P < 0.01$ vs WT vírgenes; Fig. 35 A), para retornar en la gestación a término a los niveles presentes en los animales control virgen. En cuanto al efecto de la deficiencia de IL-6, a pesar de que no hemos detectado diferencias basales entre genotipos en los niveles de ARNm de este neuropéptido, curiosamente la estimulación de su expresión génica en la gestación intermedia es abolida por la ausencia de esta citoquina (Fig. 35). Además al analizar los datos en función de los controles vírgenes correspondientes en cada genotipo, se observa que durante la primera semana de gestación la expresión de TRH se encuentra significativamente inhibida en ausencia de IL-6 (porcentaje respecto a los niveles en ratones IL-6 KO vírgenes: Gestantes IL-6 KO= $80.90 \pm 2.72\%$; $P < 0.001$ vs IL-6 KO vírgenes (Fig.35).

En resumen, el mayor aumento de las reservas grasas observado en nuestro modelo durante las dos primeras semanas del periodo gestacional podría ser debido a los reducidos niveles de expresión de TRH en ratones IL-6 KO gestantes durante las dos primeras semanas de la misma.

Por último, se ha estudiado la evolución a lo largo de la gestación de la expresión de MCH y prepro-orexina, dos péptidos producidos predominantemente en el AHL. Aunque inicialmente ambos fueron descubiertos en base a sus propiedades orexigénicas, en la actualidad es bien conocido su papel en la regulación del gasto energético y la función reproductora a nivel central (244,248). A pesar de las discrepancias existentes acerca de la modulación de la expresión hipotalámica de MCH y prepro-orexina durante la gestación en la rata, en este estudio no hemos detectado cambios en el contenido de ARNm de los mismos, en ninguna de las fases de la gestación, con respecto a los controles vírgenes (Fig. 36 y 37).

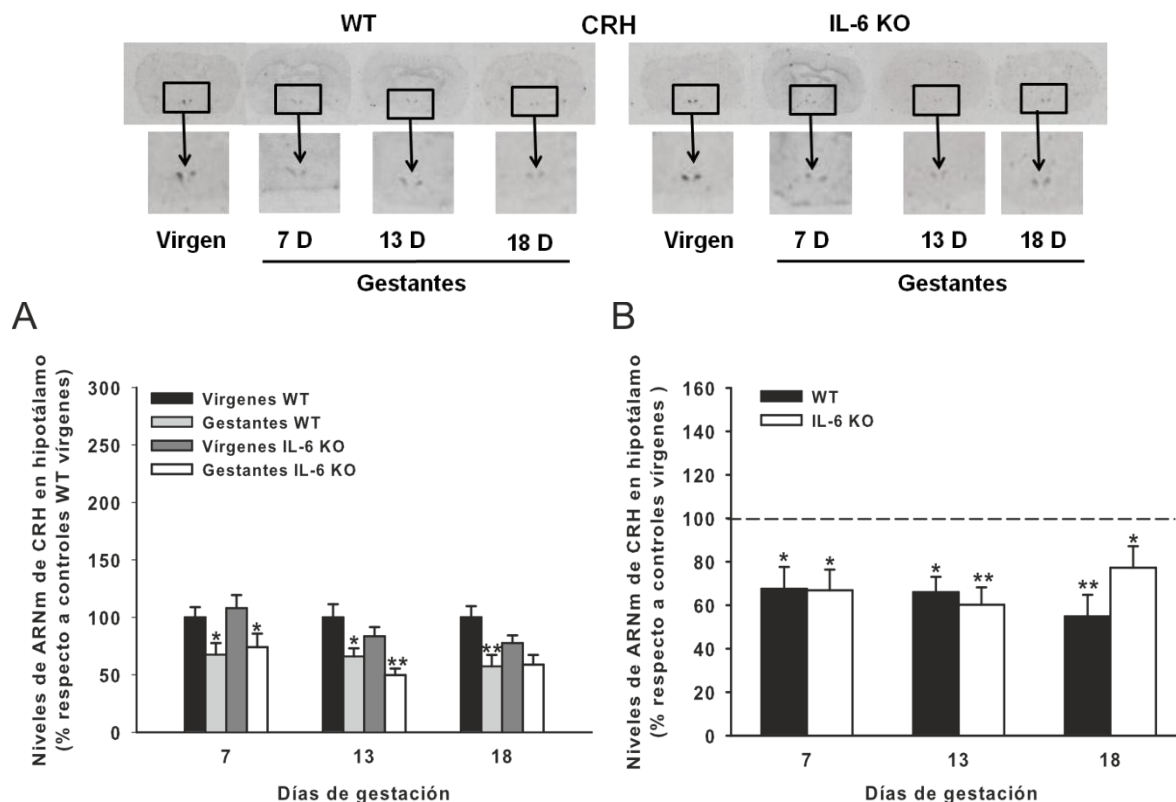


Figura 34. Niveles de ARNm de CRH en hipotálamo en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a vírgenes correspondientes; Nivel de significación respecto a ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 7-8$ animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y $n = 15-16$ animales/grupo para gestantes 18 días.

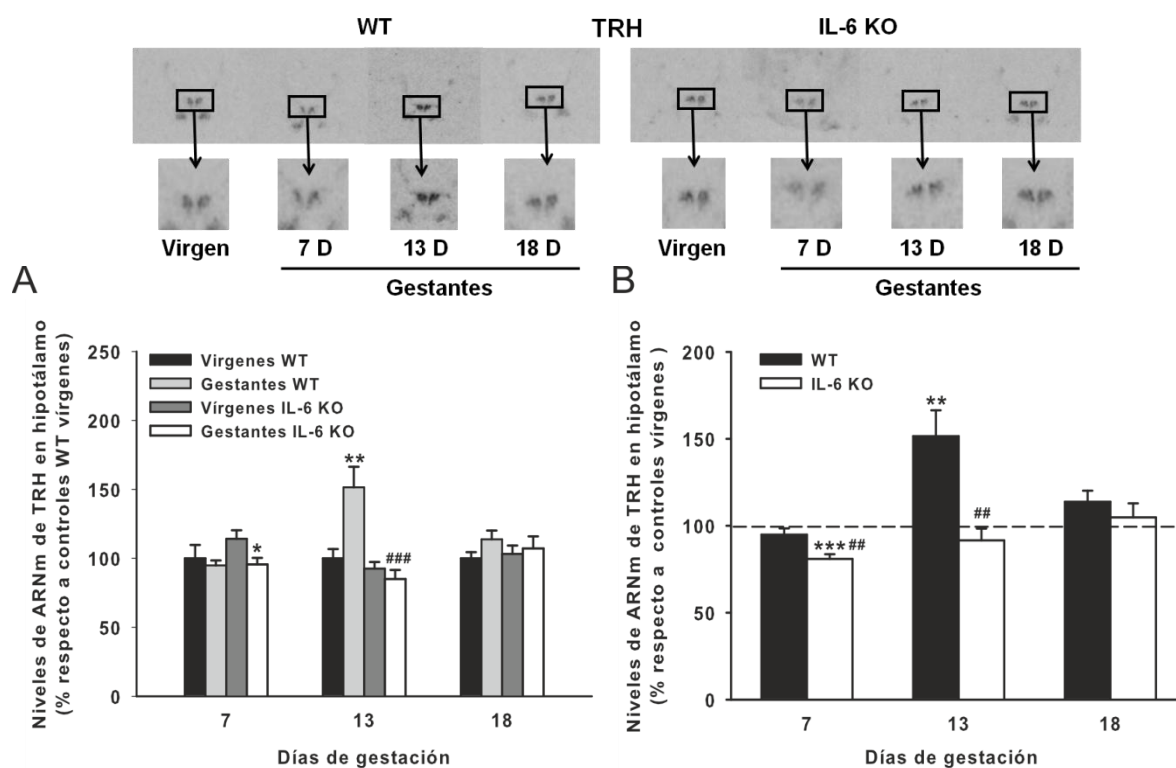


Figura 35. Niveles de ARNm de TRH en hipotálamo en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a vírgenes correspondientes. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y respecto a controles WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 9-12$ animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y $n = 11-12$ animales/grupo para gestantes 18 días.

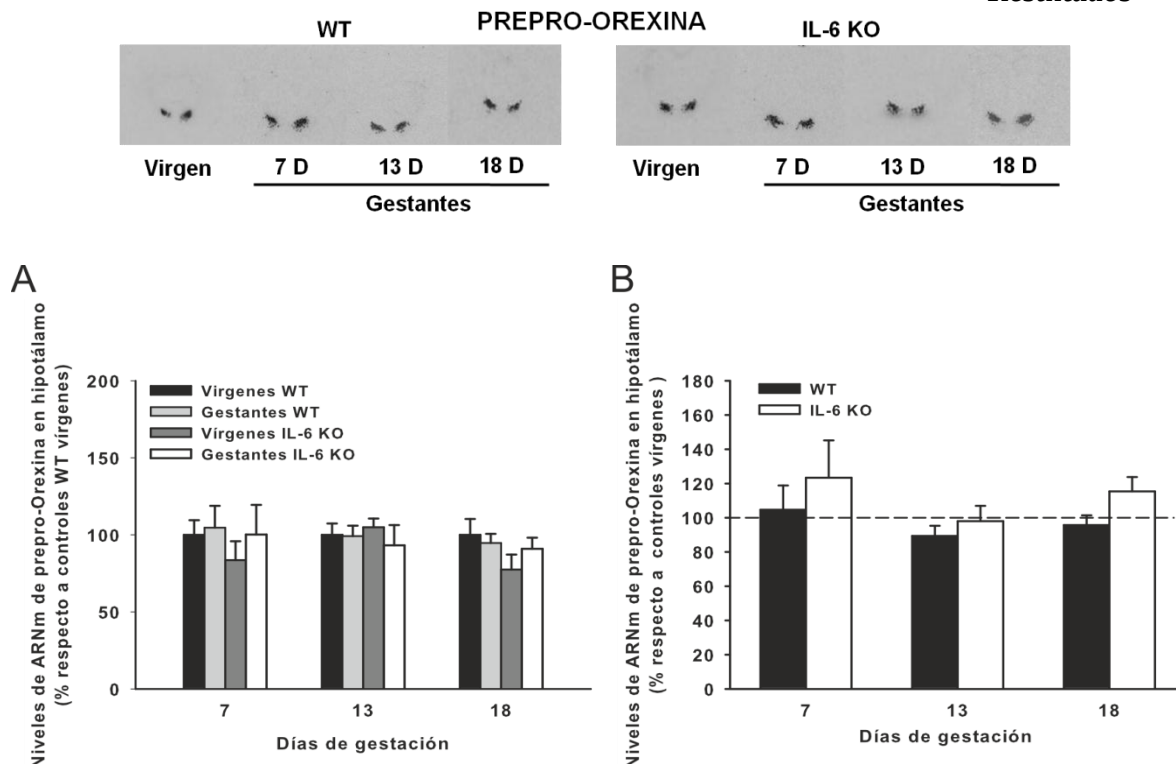


Figura 36. Niveles de ARNm de prepro-orexina en hipotálamo en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a vírgenes correspondientes; n= 10-12 animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y n=15-16 animales/grupo para gestantes 18 días.

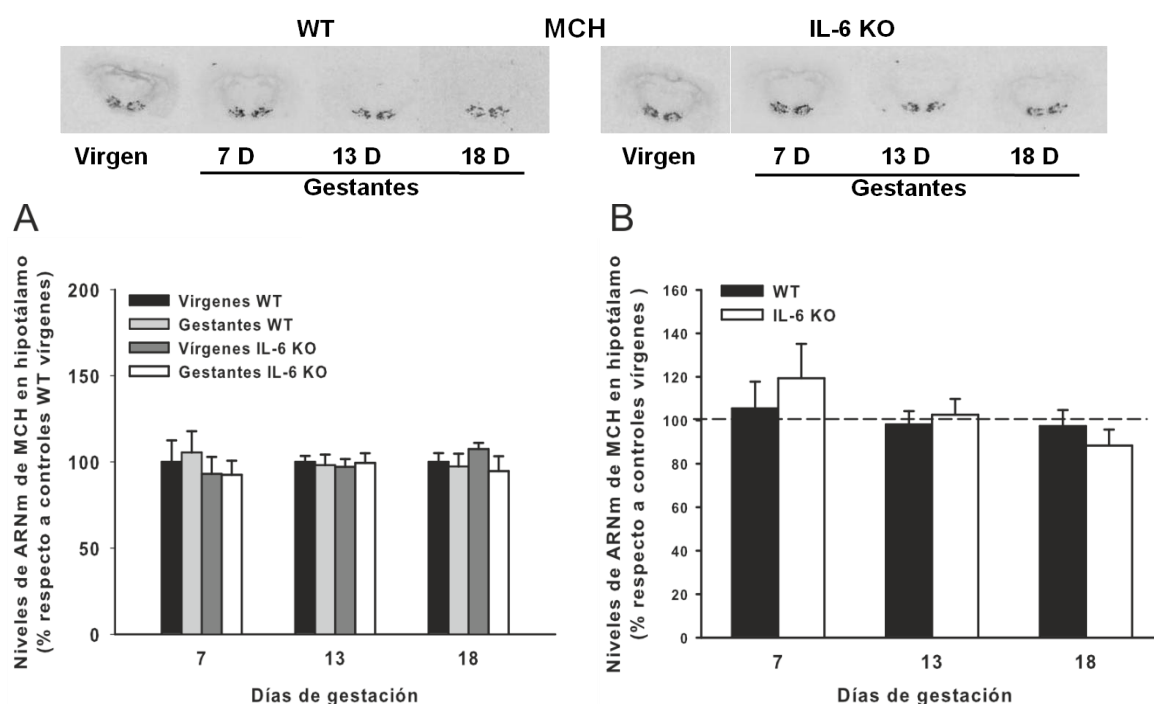


Figura 37. Niveles de ARNm de MCH en hipotálamo en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a vírgenes correspondientes; n= 10-12 animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y n=15-16 animales/grupo para gestantes 18 días

Como ya se mencionó en el apartado 5.2 de la introducción, la lactancia es la fase del ciclo reproductivo que supone un mayor coste energético para el organismo materno. El marcado incremento de la tasa de ingesta es quizás, la primera y más significativa de todas las adaptaciones fisiológicas que tienen lugar en este estado, con el fin de cubrir estas necesidades energéticas. Por tanto en este estado, y como es de esperar, las alteraciones en los circuitos centrales implicados en la regulación de la homeostasis energética son más drásticas, si cabe, que las observadas durante la gestación y, parecen estar mediadas, al menos en la rata, por las poblaciones neuronales productoras de NPY/AgRP y POMC en el núcleo ARC y NPY en el núcleo DM (514,524,525).

En el caso de NPY, nuestros resultados indican que, el incremento en la producción de este neuropéptido a nivel del ARC, que se iniciaba ya en la segunda mitad de la gestación, se mantiene tras el parto. De tal manera que, los niveles de ARNm de NPY en ratones lactantes de genotipo salvaje son un 40% superiores a los observados en sus controles vírgenes tanto a los 7 como a los 14 días p.p. (Fig. 38. A). A diferencia de lo que ocurre en el caso de la rata, y de acuerdo con lo descrito por otros autores (241), no hemos detectado una activación de las neuronas productoras de NPY en el núcleo DM durante la lactancia. Por otro lado, en ausencia de IL-6 no observamos efecto alguno sobre la expresión de este neuropéptido en animales vírgenes, siendo ésta similar en hembras lactantes de ambos genotipos a los 7 días p.p. Sin embargo, en la lactancia intermedia (14 días p.p.) se produce un incremento de aproximadamente un 60% en los niveles de ARNm de NPY en el núcleo ARC de ratones IL-6 KO respecto a sus controles WT en el mismo estado reproductivo (porcentaje respecto a los niveles en ratones WT vírgenes: Lactantes IL-6 KO= $200.12 \pm 18.34\%$ vs Lactantes WT= $138 \pm 13.63\%$; $P < 0.05$).

En cuanto a la expresión de AgRP, como puede observarse en la Fig. 38 B, sólo hemos detectado una significativa elevación de la misma en la segunda semana de lactancia (14 días p.p.), siendo esta similar entre hembras lactantes de ambos genotipos.

De forma similar, los niveles de ARNm de POMC que se mantenían reducidos al final de la gestación retornan a sus niveles basales 7 días tras el parto (Fig. 38 C). Sin embargo, en la segunda semana de lactancia se produce de nuevo una significativa disminución de la expresión de este neuropéptido en ambos genotipos. No obstante, cuando los resultados son analizados en relación a los controles vírgenes correspondientes en cada genotipo, se observa que esta inhibición es más marcada en ausencia de IL-6 (porcentaje respecto a los niveles en ratones control vírgenes: Lactantes IL-6 KO= $58.14 \pm 3.34\%$ vs Lactantes WT= $76.89 \pm 5.78\%$; $P < 0.05$).

En resumen, durante la lactancia, el mayor incremento en la expresión de NPY y la mayor inhibición en la producción de POMC en el núcleo ARC hipotalámico en ausencia de IL-6, podrían contribuir a la menor movilización de reservas grasas observada en nuestro modelo.

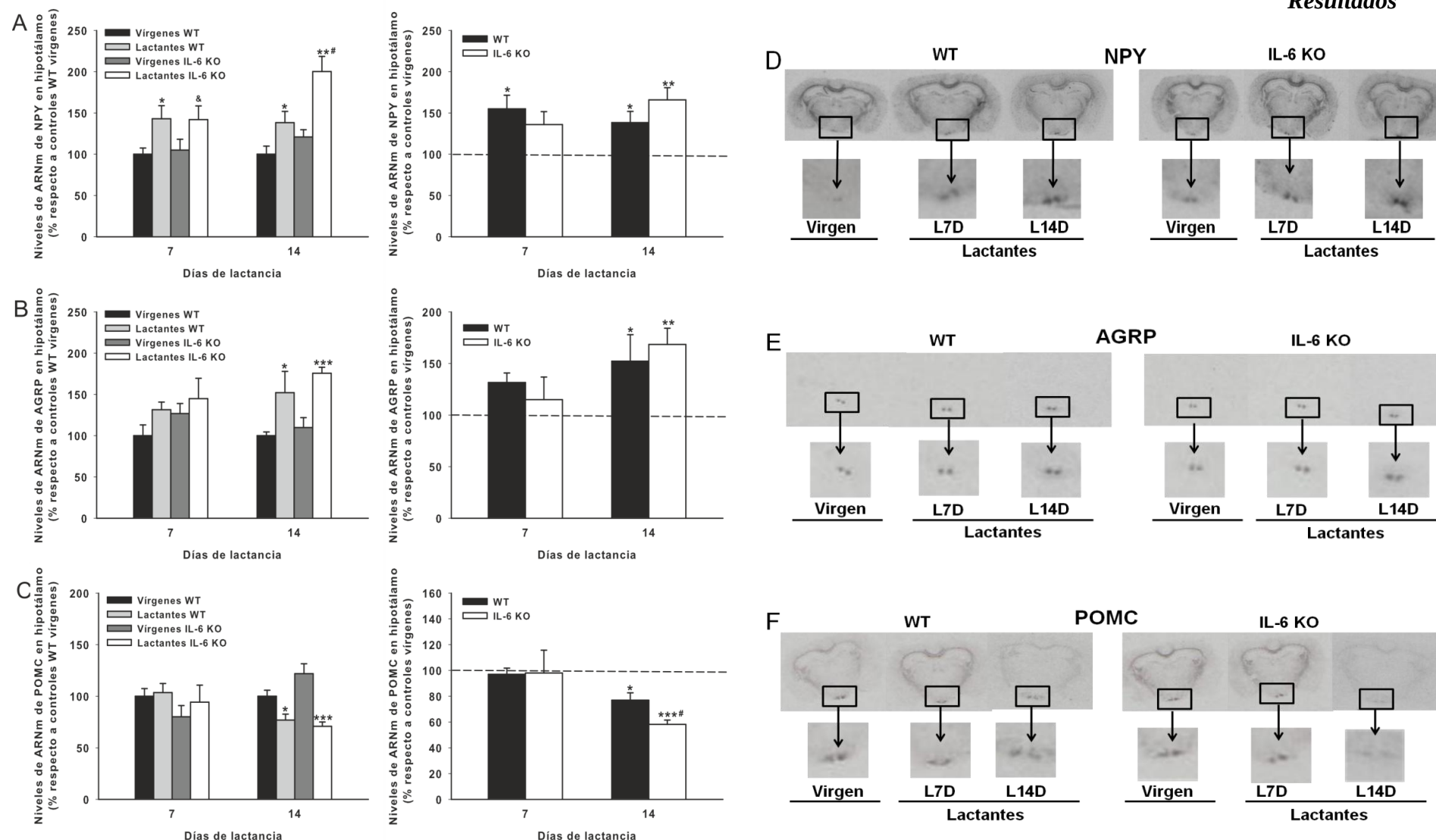


Figura 38. Niveles de ARNm de NPY (A), AGRP (B) y POMC (C) en el núcleo ARC hipotalámico de ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). Panel izquierdo: Valores respecto a control WT virgen. Panel derecho: Valores respecto a vírgenes correspondientes. D-F) Imágenes autorradiográficas representativas de cada grupo experimental. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$ y respecto a animales WT virgen & $P < 0.05$. NPY, $n = 14-16$ animales/grupo para lactantes 7 días y $N = 7-12$ animales/grupo para lactantes 14 días. AGRP, $n = 15-16$ animales/grupo para lactantes 7 días y $n = 7-8$ animales/grupo para gestantes de 14 días. POMC, $n = 7-8$ animales/grupo para gestantes 18 días y $n = 5-8$ animales/grupo para lactantes de 7 y 14 días.

En este trabajo se ha evaluado además el efecto de la lactancia y de la deficiencia de IL-6 sobre los niveles de ARNm de CRH y TRH a nivel del núcleo PV. Como se mencionó en la introducción, esta región hipotalámica está estrechamente relacionada con el ARC recibiendo profusas proyecciones neurales del mismo. Nuestros resultados indican que la lactancia, al igual que la gestación, tiene un profundo efecto inhibitor sobre la expresión de CRH a nivel del núcleo PV (50% y 30% inferiores a los observados en animales vírgenes a los 7 y 14 d.p.p., respectivamente; (Fig. 39), reflejando la marcada reducción de la actividad del eje HHA en este estado. Sin embargo, no se ha detectado efecto alguno de la deficiencia de IL-6 sobre los niveles hipotalámicos de ARNm de este neuropéptido en ninguna de las etapas de la lactancia analizadas. Por tanto, la inhibición de la expresión de CRH en el núcleo PV a lo largo de la lactancia favorecería, junto con los cambios en la producción de NPY, AgRP y POMC en el ARC, el desarrollo de la marcada hiperfagia observada durante la lactancia en ambas cepas de ratones.

Con respecto a TRH, aunque se ha descrito que el estímulo de succión induce un marcado incremento de la concentración de ARNm de este neuropéptido, este efecto es observable únicamente durante los primeros días de la lactancia o al restituir las crías a la madre tras un periodo de separación (551,593). Por ello, en este caso hemos analizado únicamente la expresión de TRH en la primera semana de lactancia. Así, a diferencia de lo que ocurría durante la gestación, a los 7 días p.p. no hemos detectado diferencias en los niveles de ARNm de TRH entre ratones vírgenes y lactantes en ninguna de las cepas estudiadas (Fig. 40). Sin embargo, no podemos excluir la posible existencia de modificaciones en su expresión en días previos, tal y como se ha descrito en la rata.

Por último, se ha analizado además el efecto de la lactancia y la deficiencia de IL-6 sobre la expresión de MCH y prepro-Orexina en el AHL. Nuevamente, y teniendo en cuenta la ausencia de modificaciones en la expresión de ambos neuropéptidos durante la gestación, nos concentramos únicamente en la semana posterior al parto. De hecho, los resultados obtenidos indican que tanto los niveles de ARNm de MCH como de prepro-OX no se ven afectados ni por la ausencia de IL-6 ni por la lactancia (Fig. 41 y 42).

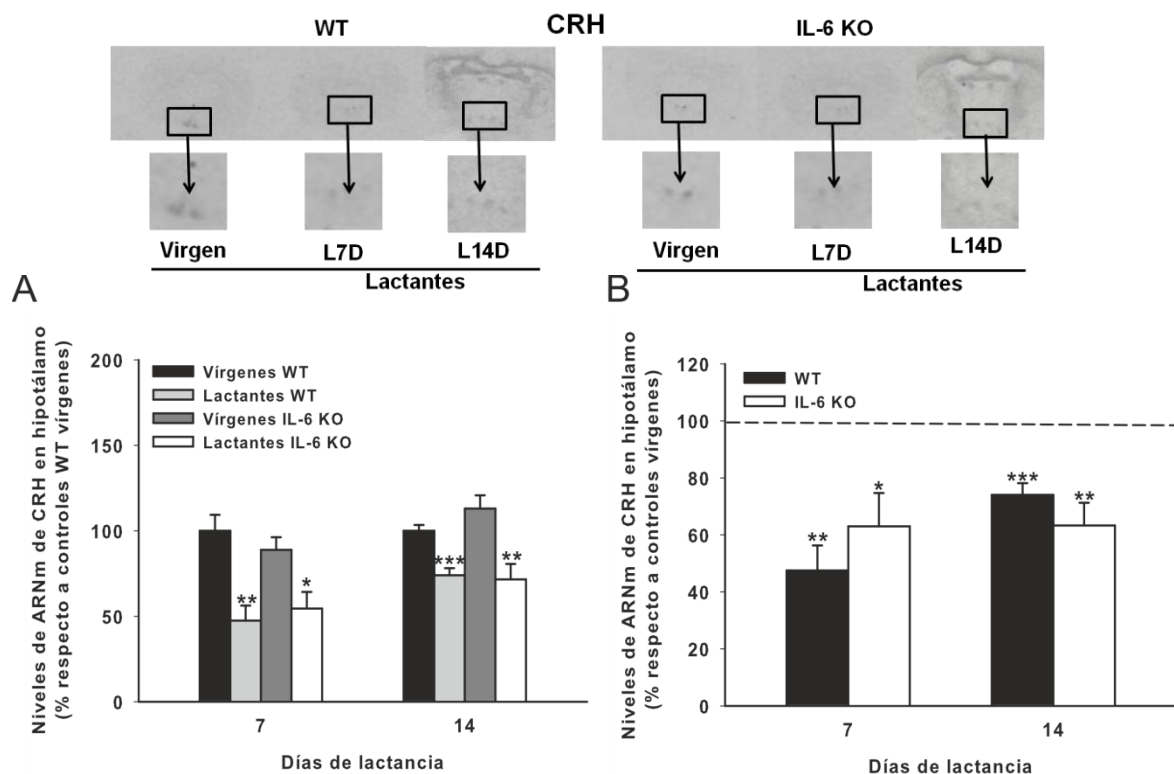


Figura 39. Niveles de ARNm de CRH en hipotálamo en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a vírgenes correspondientes. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$; $n = 6-7$ animales/grupo para lactantes 7 días y $n = 5-8$ animales/grupo para lactantes de 14 días.**

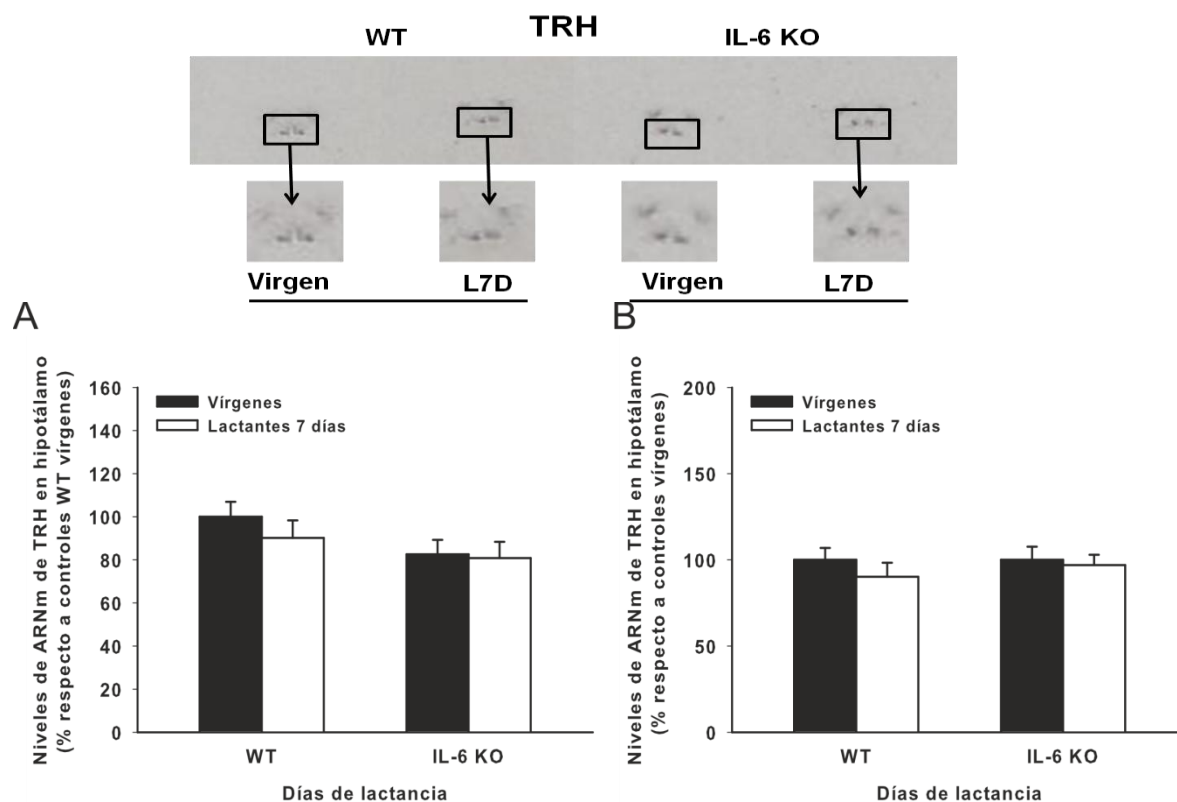


Figura 40. Niveles de ARNm de TRH en hipotálamo en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a vírgenes correspondientes; $n = 7$ animales/grupo para lactantes 7 días.

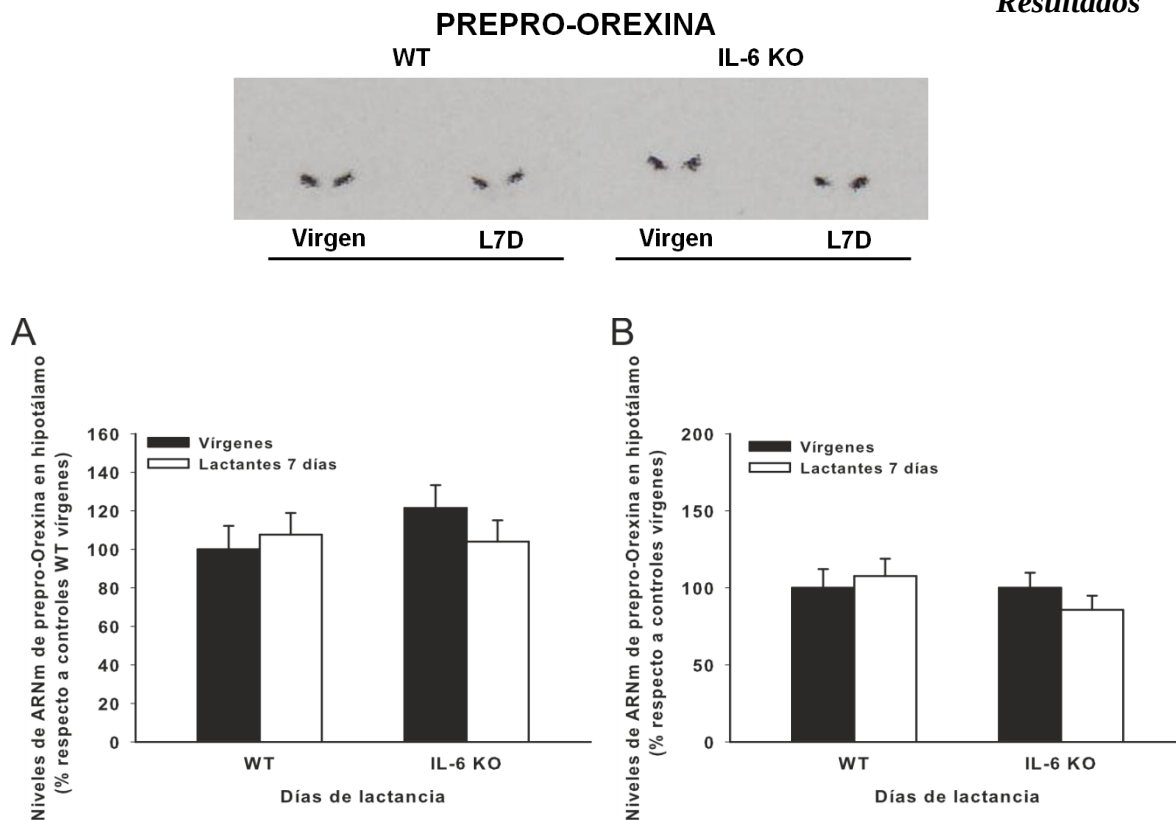


Figura 41. Niveles de ARNm de prepro-Orexina en hipotálamo en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) a los 7 días p.p.) A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a vírgenes correspondientes; n=7 animales/grupo.

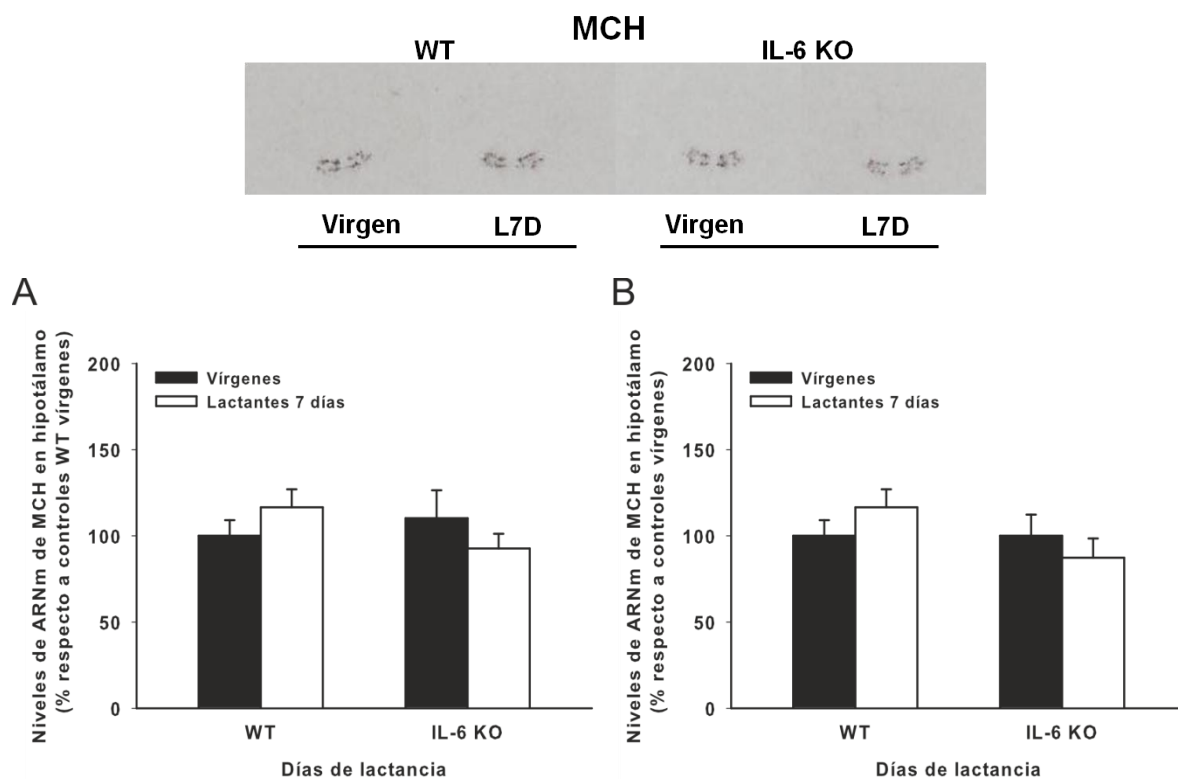


Figura 42. Niveles de ARNm de MCH en hipotálamo en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) a los 7 días p.p.) A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a vírgenes correspondientes; n=7 animales/grupo.

6. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 SOBRE LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN Y EL GASTO ENERGÉTICO BASAL Y DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA

Tal y como se describió previamente (introducción, apartado 4.1) tanto el peso como la magnitud de los depósitos grasos del individuo fluctúan dependiendo de la diferencia entre el aporte de energía a través de la ingesta de alimentos y del gasto energético. Teniendo en cuenta el hecho de que únicamente se haya observado un efecto de la ausencia de IL-6 endógena sobre la tasa de ingesta durante la primera etapa de la gestación (0-7 días p.c., resultados, apartado 2) y la diferencia existente entre genotipos en el perfil de acúmulo graso durante la gestación y la lactancia, decidimos analizar si esta última podría ser causada por la presencia de un menor gasto energético basal y disminución de la termogénesis adaptativa en nuestro modelo a lo largo del ciclo reproductivo. En este contexto, es de vital relevancia el papel del TAM encargado de transformar la energía procedente de la metabolización de los alimentos en calor. El proceso de reclutamiento y activación de este tejido (que resulta en una mayor capacidad termogénica) como su actividad, es decir la producción de calor per se, y la inervación del mismo por el SNS. La producción de calor por el TAM se pone en marcha siempre que el organismo necesita un aporte calorífico extraordinario, por ejemplo en el periodo post natal o en el inicio de estados febriles, siendo la tasa de termogénesis controlada por distintos circuitos centrales que tienen su origen en el hipotálamo (304). A lo largo del ciclo reproductivo, y como consecuencia de las demandas energéticas tanto del crecimiento fetal como de la lactogénesis, se produce un proceso de atrofia funcional del TAM. Sin embargo los mecanismos y los factores implicados en este proceso difieren entre la gestación y la lactancia (493,558,561,594-596). Por tanto a continuación y para simplificar la comprensión de los resultados, se presentarán la totalidad de los datos del estudio realizado en animales gestantes para luego continuar con los correspondientes al periodo de lactancia.

6.1. Evolución del peso del TAM durante la gestación.

La atrofia funcional del TAM durante la gestación es el resultado de un progresivo aumento del tamaño de este tejido que alcanza su máximo al término de la misma. Este proceso, al menos en el ratón, no es causado por un incremento de la concentración proteica, sino como consecuencia de un mayor acúmulo de grasa en este tejido (594).

Con el fin de analizar la posible influencia de IL-6 sobre este proceso se evaluó la evolución del peso del TAM en nuestro modelo durante la gestación.

De acuerdo con lo previamente descrito por otros autores, nuestros datos indican que a los 18 días p.c. los ratones gestantes presentan un TAM claramente hipertrofiado, siendo el peso de este tejido (tanto en valor absoluto como relativo al peso corporal) significativamente superior en ausencia de IL-6 (Fig.43). Estos datos sugieren que la ausencia de IL-6 durante la gestación podría estar asociada a un mayor acúmulo lipídico en este tejido.

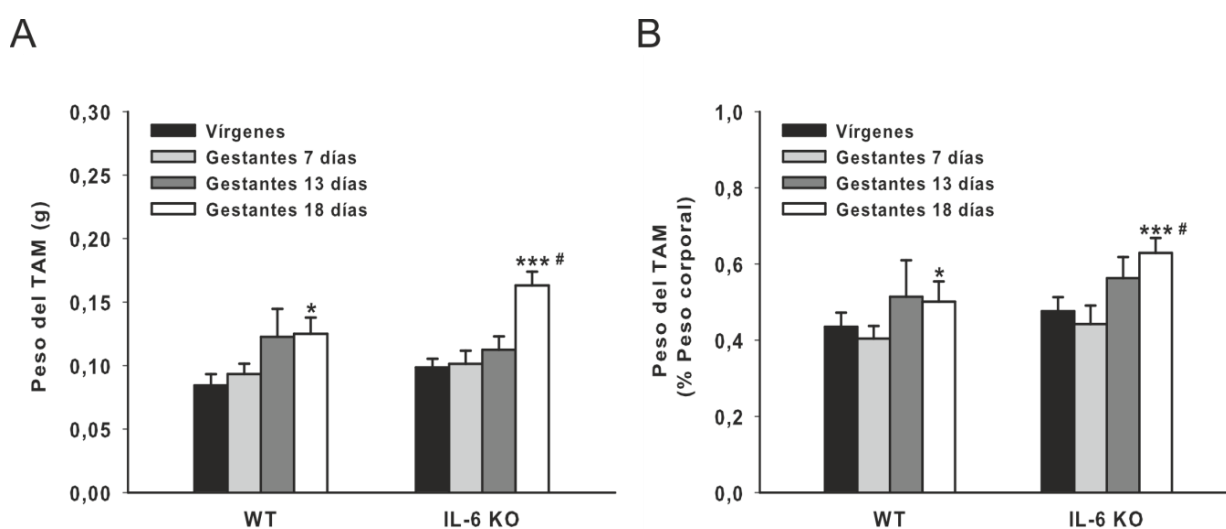


Figura 43. Evolución del peso del tejido adiposo marrón interescapular en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7,13 y 18 días p.c.). A) Peso fresco del tejido adiposo marrón interescapular. B) Valores corregidos por peso corporal. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$; n=9-15 animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y n=19-20 animales/grupo para gestantes de 18 días.

6.2. Contenido lipídico en el TAM durante la gestación intermedia

A continuación, para comprobar la existencia de un mayor acúmulo lipídico durante la gestación en el TAM interescapular, se realizó un análisis histológico de este tejido en animales vírgenes y gestantes de 13 días de ambos genotipos. Se escogió esta fase de la gestación porque, aunque en este punto temporal todavía no existían diferencias significativas en el peso fresco del tejido entre animales vírgenes y gestantes, si se observaba una tendencia hacia un mayor incremento de este parámetro en animales deficientes en IL-6 (Fig. 43B). Tal y como se puede observar en las imágenes representativas de secciones histológicas teñidas con Oil-Red (Fig. 44), y de acuerdo con lo sugerido por otros autores (594), a los 13 días de gestación los adipocitos marrones presentan ya un mayor contenido de grasas neutras. Este efecto es más marcado aún si cabe en ausencia de IL-6, de tal manera que el gran tamaño de las gotas lipídicas prácticamente impide diferenciar el núcleo celular en las secciones correspondientes a los ratones IL-6 KO gestantes.

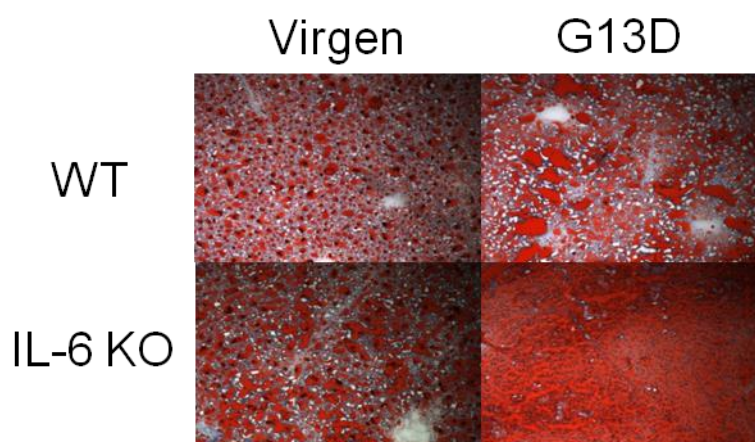


Figura 44. Contenido lipídico del tejido adiposo marrón interescapular en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) en la gestación intermedia (13 días p.c.). Imágenes representativas 10X de secciones histológicas de tejido adiposo marrón interescapular procedente de animales vírgenes y gestantes de 13 días de ambos genotipos teñidas con oil-red.

6.3. Expresión de IL-6 y su receptor IL-6R α en TAM durante la gestación.

Dado que durante la gestación en ausencia de IL-6 parece producirse un mayor acúmulo lipídico en el TAM, la siguiente cuestión que nos planteamos fue cual sería el posible papel de IL-6 en el proceso de atrofia funcional del TAM. A este respecto, se ha observado que en modelos animales de lipodistrofia (597), caracterizados por una deposición ectópica de grasa, tiene lugar un proceso de hipertrofia del TAM interescapular, asociado a un incremento del tamaño de los adipocitos marrones. Estas células presentan vacuolas lipídicas uniloculares de gran magnitud, adquiriendo un fenotipo similar al de los adipocitos blancos. En esta situación se inicia un proceso inflamatorio en este tejido, aumentándose la producción local de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α , que desemboca en último término en una atrofia funcional del TAM, reflejada en la inhibición de la expresión del marcador termogénico por excelencia UCP-1.

Por tanto y, con el fin de evaluar si la atrofia funcional del TAM durante la gestación podría estar mediada por el desarrollo de un proceso inflamatorio en este tejido, analizamos la expresión de IL-6, clásico marcador de inflamación, en muestras de TAM de ratones WT vírgenes y gestantes a los 7, 13 y 18 días p.c. Paralelamente y como complemento, analizamos además los niveles de ARNm de su receptor IL-6R α .

Nuestros datos indican que la expresión de IL-6 en este tejido incrementa marcadamente en la gestación intermedia (13 días p.c.), efecto que se ve reflejado también en un aumento de la expresión de su receptor en esa misma etapa (Fig. 45 A y B). De hecho, al analizar los niveles de ARNm de IL-6R α en ratones IL-6 KO gestantes a los 13 días p.c. no se aprecia esta modulación siendo la expresión de IL-6R α en éstos similar a la de sus controles vírgenes y significativamente inferior a la observada en animales WT gestantes (Fig. 45 C y D).

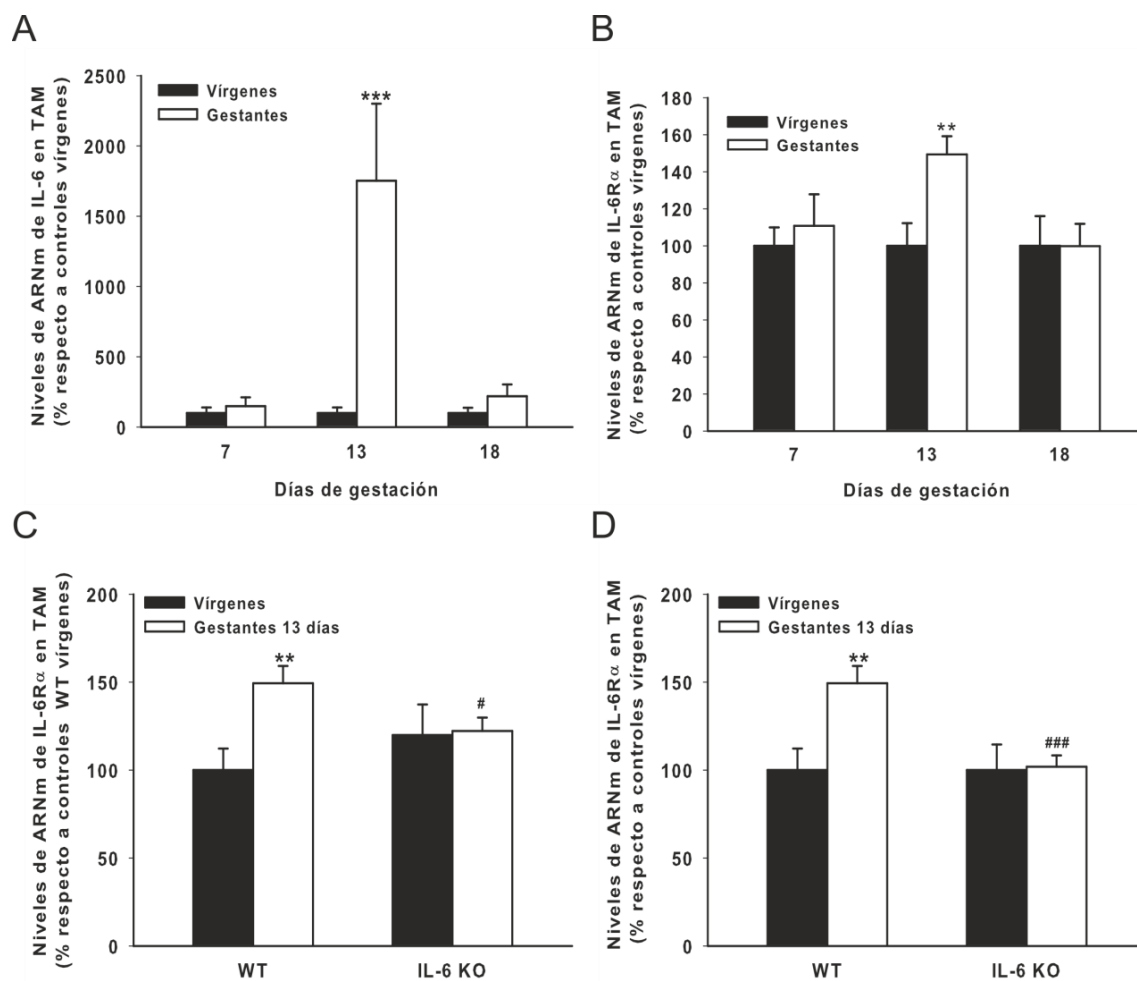


Figura 45. A) Niveles de ARNm de IL-6 y B) de IL-6R α en ratones WT durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). Niveles de ARNm de IL-6R α a los 13 días de gestación en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO), C) valores respecto a controles WT vírgenes y D) valores respecto a controles vírgenes de cada genotipo. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen ** $P < 0.01$, y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; $n = 6-8$ animales/grupo.

6.4. Efecto de IL-6 sobre la capacidad termogénica del TAM durante la gestación

La capacidad termogénica del TAM depende del número de adipocitos marrones, así como de su grado de diferenciación, la densidad mitocondrial y los niveles de expresión de genes termogénicos tejido-específicos como UCP-1 (304). Esta proteína clave en el proceso de termogénesis adaptativa, o producción de calor en respuesta a estímulos ambientales como la exposición al frío o a una dieta hipercalórica, se expresa exclusivamente en el TAM junto con otro miembro de la familia de proteínas desacoplantes, UCP-3, que además de en este tejido, es producida por el músculo esquelético (véase introducción apartado 4.2.1.3). Diversos autores han demostrado que durante la última fase de la gestación y a lo largo de la lactancia en la rata se produce una inhibición de la síntesis de ambas proteínas desacoplantes a nivel del TAM (493,562). Debido a la marcada hiperfagia materna, en general se considera que durante ambos periodos se produce una inhibición de la termogénesis inducida por la dieta (598).

6.4.1. Perfil de expresión génica de UCP-1 y UCP-3 en TAM durante la gestación

En base a lo anteriormente mencionado decidimos estudiar el perfil de expresión de ambas proteínas desacoplantes en el TAM durante la gestación y el posible papel de IL-6 en su modulación. Nuestros resultados indican que a los 13 días del inicio de la gestación los niveles de ARNm de UCP-1 en el TAM incrementan aproximadamente en un 60% respecto a los valores observados en los ratones control virgen, para luego disminuir marcadamente a los 18 días p.c. (porcentaje respecto a los niveles en ratones WT virgen: Gestantes WT= $64.61 \pm 11.31\%$, $P < 0.05$; Fig.46). La deficiencia de IL-6 no afecta a la expresión de esta proteína desacoplante en el TAM, siendo los niveles de UCP-1 similares entre hembras vírgenes de ambos genotipos. Sin embargo la aparente modulación de la expresión génica de UCP-1 durante la gestación desaparece en ausencia de IL-6. Estos resultados, podrían justificar en cierta medida el mayor depósito de grasa observado en nuestro modelo durante este periodo.

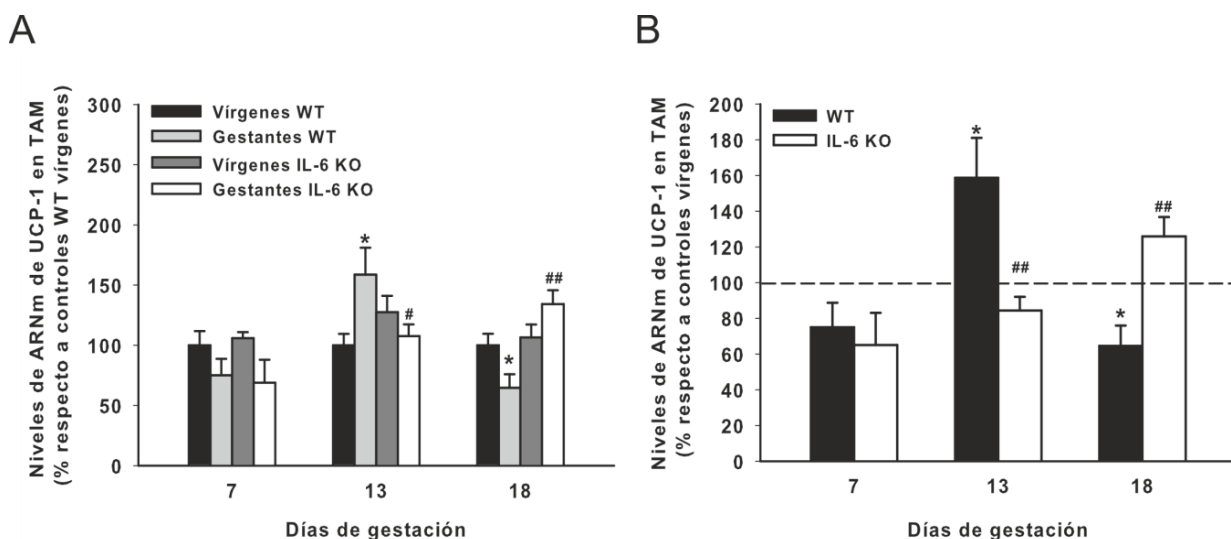
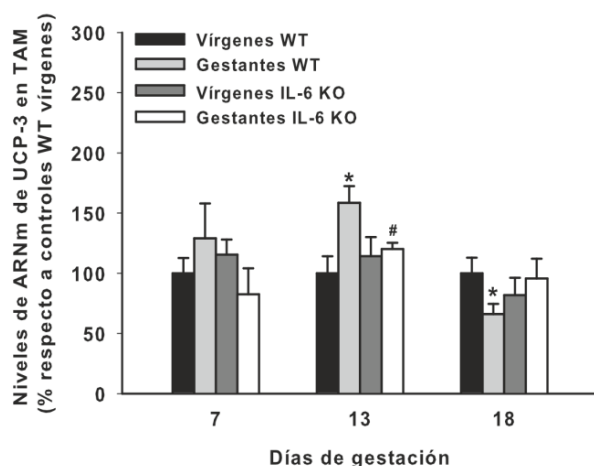


Figura 46. Niveles de ARNm de UCP-1 en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 5-8$ animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y $n = 6-10$ animales/grupo para gestantes de 18 días.

En cuanto a UCP-3, esta proteína desacoplante presenta un patrón de expresión similar a UCP-1 durante la gestación, elevándose significativamente a los 13 días p.c. y reduciéndose a los 18 días p.c., hasta prácticamente alcanzar un 60% de los niveles de ARNm observados en ratones control virgen. Nuevamente, la ausencia de IL-6 no afecta a la expresión de UCP-3 y no se han encontrado cambios en los niveles de ARNm de esta proteína entre ratones IL-6 KO vírgenes y gestantes en ninguno de los puntos temporales estudiados (Fig. 47).

A



B

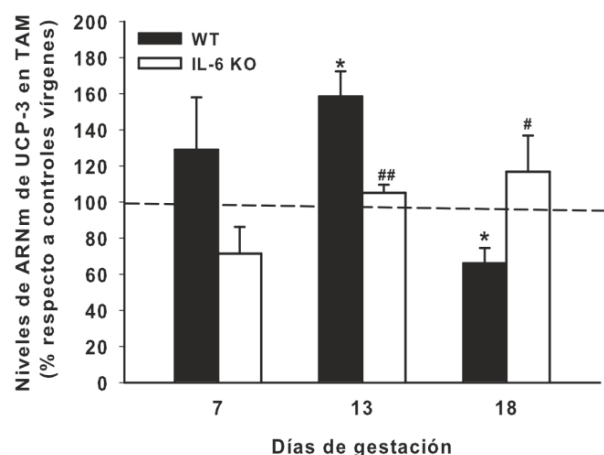


Figura 47. Niveles de ARNm de UCP-3 en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 5-8$ animales/grupo para gestantes de 7 y 13 días y $n = 6-10$ animales/grupo para gestantes de 18 días.

6.4.2. Perfil de expresión proteica de UCP-1 y UCP-3 en TAM durante la gestación

Posteriormente, decidimos comprobar si los resultados obtenidos acerca del patrón de expresión génica en el TAM de las proteínas desacoplantes UCP-1 y 3 se reproducían a nivel proteico.

Con respecto a UCP-1, a pesar del incremento observado en sus niveles de ARNm a los 13 días de gestación únicamente detectamos un ligero incremento de su contenido proteico en el TAM que, sin embargo no llega a ser significativo (Fig. 48). Por el contrario en la última etapa de la gestación (18 días p.c.), al igual que ocurría a nivel transcripcional, observamos una reducción significativa de la expresión proteica de UCP-1 (porcentaje respecto a los niveles en ratones WT virgen: Gestantes WT = $64.61 \pm 11.31\%$, $P < 0.05$; Fig. 48). Igualmente, el contenido de UCP-1, es similar en el TAM de ratones vírgenes WT e IL-6 KO y en ausencia de IL-6 no se apreciaron variaciones en el mismo, en ninguno de los puntos temporales de la gestación. Por último, el perfil de expresión proteica de UCP-3 durante la gestación y en ausencia de IL-6 reproduce fielmente los resultados obtenidos a nivel transcripcional (Fig. 49).

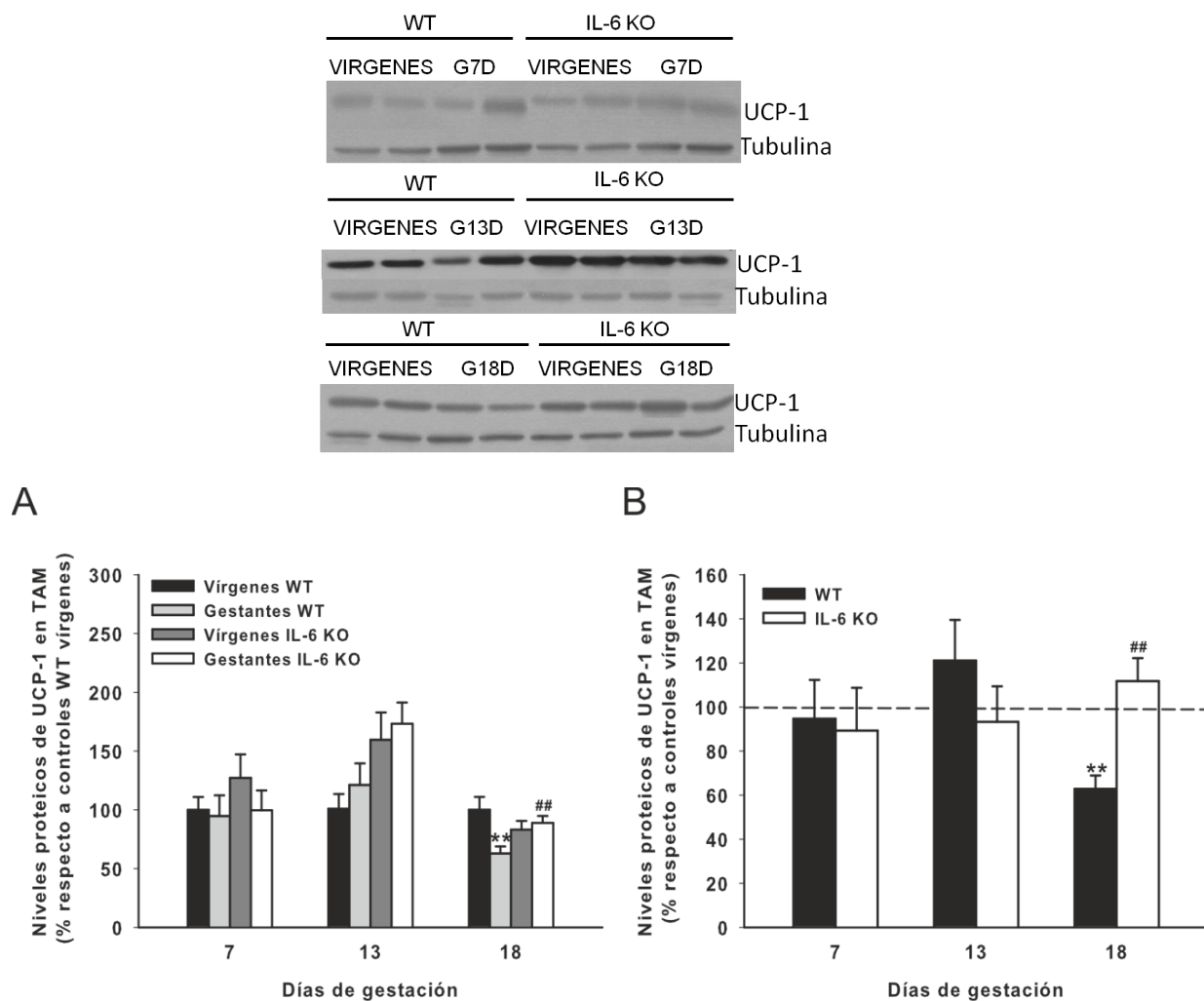


Figura 48. Niveles de expresión proteica de UCP1 en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Valores respecto a controles WT vírgenes. B) Valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen ** $P < 0.01$ y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo ## $P < 0.01$; $n = 5-8$ animales/grupo

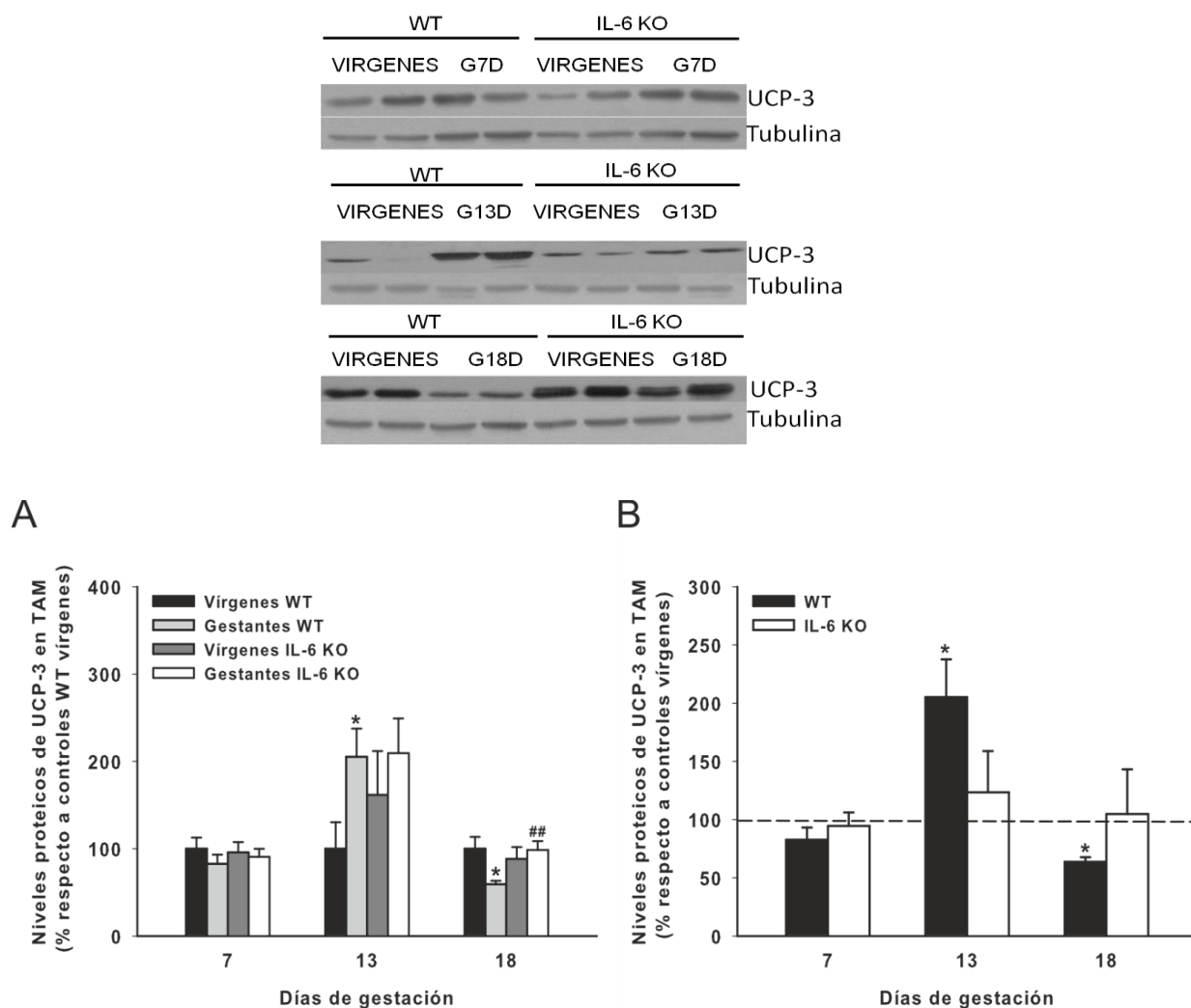


Figura 49. Niveles de expresión proteica de UCP-3 en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.01$ y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo ## $P < 0.01$; $n = 5-8$ animales/grupo

6.4.3. Efecto de IL-6 sobre las vías moleculares implicadas la activación de la termogénesis adaptativa en el TAM durante la gestación

Teniendo en cuenta los cambios observados en la expresión de las proteínas desacoplates UCP-1 y -3 durante la gestación en nuestro modelo, decidimos analizar cuáles podrían ser las vías implicadas en la participación de IL-6 en la regulación del programa termogénico durante la gestación. Como se mencionó en la introducción y en vista de los resultados obtenidos, la gestación al igual que la lactancia, podría considerarse, dada la hiperfagia característica de este estado, como un excelente modelo de inhibición de la termogénesis adaptativa. El evento que marca la activación del TAM en respuesta a una ingesta hipercalórica o a la exposición al frío es la activación de la innervación simpática de este tejido con el consecuente incremento de los niveles de AMPc intracelular. Aunque el S.N.S. es un importante estimulador de la actividad del TAM, los efectos de su principal neurotransmisor noradrenalina en este tejido dependen del balance de subtipos receptores adrenérgicos en la membrana del adipocito marrón. Así, la estimulación de los receptores β_3 da lugar a un incremento en los niveles de AMPc, estimulando en último término no sólo la expresión del gen de UCP-1 sino también de otras proteínas implicadas en el programa termogénico como PGC-1 α , PPAR γ , la deiodinasa-2 (DIO2) o LSH; mientras que por el contrario la estimulación de los receptores α_2 , conduce a una reducción de los niveles de AMPc generando el efecto contrario (Fig. 50). Por tanto la relación α_2/β_3 es un indicativo no sólo del grado de reclutamiento y activación de este tejido sino también del grado de movilización lipídica en el mismo.

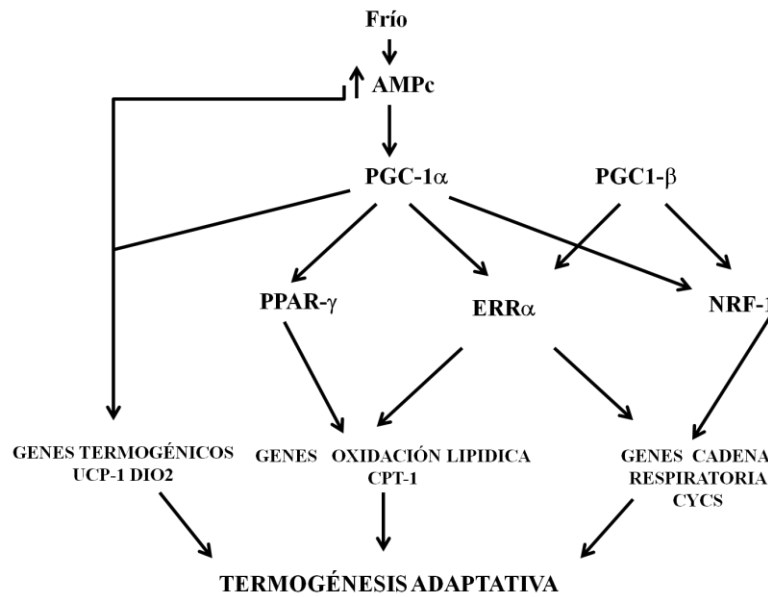


Figura 50. Esquema de las diferentes vías implicadas en la modulación de la termogénesis adaptativa.

Por ello nuestro primer paso fue analizar la evolución de los niveles de expresión de los receptores adrenérgicos $\beta 3$ y $\alpha 2$, así como la relación entre los mismos, a lo largo de la gestación en el TAM y el efecto de la ausencia de IL-6 endógena sobre estos parámetros. Así, aunque a las 13-14 semanas de edad los niveles de ARNm del receptor $\beta 3$ son significativamente menores en los animales vírgenes deficientes en IL-6 que en sus controles WT (Fig. 51 A) y que, en ambos grupos de edad no se observaron cambios significativos en la expresión del receptor $\alpha 2$ entre genotipos (Fig. 51 B), la relación $\alpha 2/\beta 3$ es similar en ratones vírgenes de ambas cepas (Fig. 51 C). Por el contrario a las 15 semanas de edad los niveles de ARNm de $\beta 3$, $\alpha 2$ y la relación $\alpha 2/\beta 3$ son similares en animales vírgenes de ambos genotipos.

Los resultados obtenidos indican que la expresión del receptor $\beta 3$ en este tejido es modulada por la gestación, reduciéndose a la mitad de los valores de los controles vírgenes durante la gestación temprana, efecto que se revierte en la gestación intermedia, reduciéndose nuevamente en la gestación a término (Fig. 51 A). Por el contrario, este perfil de expresión es invertido en cierta medida en el caso del receptor $\alpha 2$: no observándose diferencias en el contenido de su ARNm entre hembras vírgenes y gestantes al inicio de la misma, para luego elevarse en la gestación intermedia retornando a los niveles basales en la gestación a término (Fig. 51 B). De esta manera la

relación $\alpha 2/\beta 3$, aunque tiende a elevarse en la primera semana del periodo gestacional, no es hasta la gestación intermedia que este incremento alcanza una significación positiva ($P < 0.05$ para WT vírgenes vs WT gestantes de 13 días; Fig. 51 C). Finalmente, en la gestación a término este parámetro retorna a los valores basales observados en los ratones control virgen. Por otro lado, en cuanto al efecto de IL-6 sobre la expresión del receptor $\beta 3$ en este periodo reproductivo, nuestros datos muestran que la inhibición observada en los niveles de ARNm de este receptor durante la gestación a término es revertida por la deficiencia de esta citoquina (Fig. 51 A panel izquierdo), efecto que se manifiesta de igual manera a los 7 días p.c. cuando los resultados son analizados en relación a los niveles en los ratones control virgen del mismo genotipo (Fig. 51 A panel derecho). Finalmente, no hemos detectado efecto alguno de la ausencia de IL-6 sobre el perfil de expresión gestacional del receptor $\alpha 2$ (Fig. 51 B), ni en la relación $\alpha 2/\beta 3$ en animales gestantes de 7 y 13 días (Fig. 51 C). Por el contrario, durante la última etapa de la gestación, mientras que la relación $\alpha 2R/\beta 3R$ en ratones WT retorna a los niveles basales, en ratones IL-6 KO este parámetro se mantiene todavía significativamente elevado, cuando es corregido en relación a los valores de sus correspondientes controles vírgenes (Fig. 51 C). Estos resultados sugieren que la deficiencia de IL-6 podría inducir un aumento más marcado del depósito lipídico en el TAM, que podría justificar el mayor incremento del peso de este tejido en nuestro modelo durante la gestación.

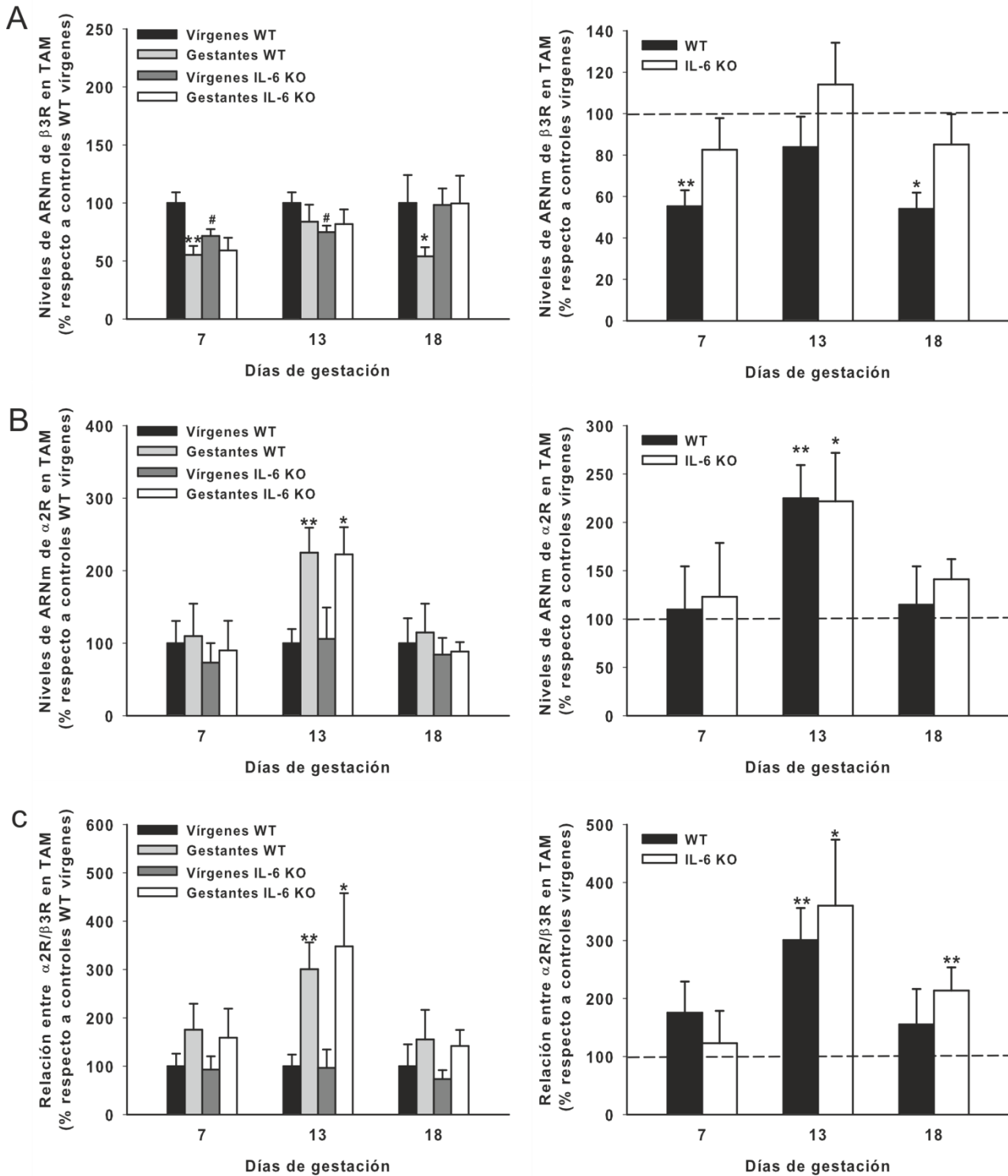


Figura 51. Niveles de ARNm de $\beta 3R$ y $\alpha 2R$ adrenérgicos en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Niveles de ARNm de receptor $\beta 3$; B) Niveles de ARNm de receptor $\alpha 2$; C) Relación entre niveles de ARNm de los receptores $\alpha 2/\beta 3$. Panel izquierdo: valores respecto a control WT virgen y panel derecho: valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$; $n = 5-8$ animales/grupo.

A continuación y teniendo en cuenta que las hormonas tiroideas son clásicos moduladores de la termogénesis y que el balance entre T3 (forma activa) y T4 (forma inactiva) depende de la actividad de la enzima deiodinasa, cuya transcripción es dependiente de AMPc, decidimos evaluar el patrón de expresión de esta enzima durante la gestación en el tejido adiposo marrón en animales IL-6 KO.

Como se muestra en la Fig. 52 A, independientemente del estado reproductivo del animal la ausencia de IL-6 endógena no ejercía efecto alguno sobre la expresión de esta enzima en el TAM. Así, los niveles de ARNm de deiodinasa se encuentran significativamente reducidos en los ratones gestantes tanto de genotipo salvaje como deficientes en IL-6 (Fig.52 A), reflejando la reducción de los niveles intracelulares de AMPc en el adipocito marrón, como consecuencia del incremento de la relación $\alpha 2R/\beta 3R$.

Por otro lado, los niveles de ácidos grasos en el TAM son cruciales en el proceso termogénico. Así, por un lado actúan como importantes co-activadores de la actividad de la proteína UCP-1 y por otro, constituyen una fuente de energía metabólica para el funcionamiento de la maquinaria termogénica, estando sus niveles directamente relacionados con la actividad de la lipasa sensible a hormonas (LSH). Al igual que la deiodinasa la expresión de esta enzima es dependiente de los niveles de AMPc.

Nuestros resultados muestran que la expresión de esta enzima en el TAM no se ve alterada por la deficiencia de IL-6 (Fig. 52 B panel izquierdo), no observándose cambios en la misma durante la primera semana de la gestación tanto en los ratones WT como en los IL-6 KO. Sin embargo, en la gestación intermedia se observa una tendencia hacia la inhibición de su expresión que alcanza una significación positiva a los 18 días p.c. únicamente en los animales de genotipo salvaje, siendo los niveles de ARNm de LSH en los ratones WT gestantes un 50% inferiores a los presentes en sus correspondientes controles vírgenes (Fig.52 B panel derecho). Esta reducción de LSH a nivel transcripcional podría contribuir a la inhibición de la capacidad termogénica del TAM en esta última etapa de la gestación.

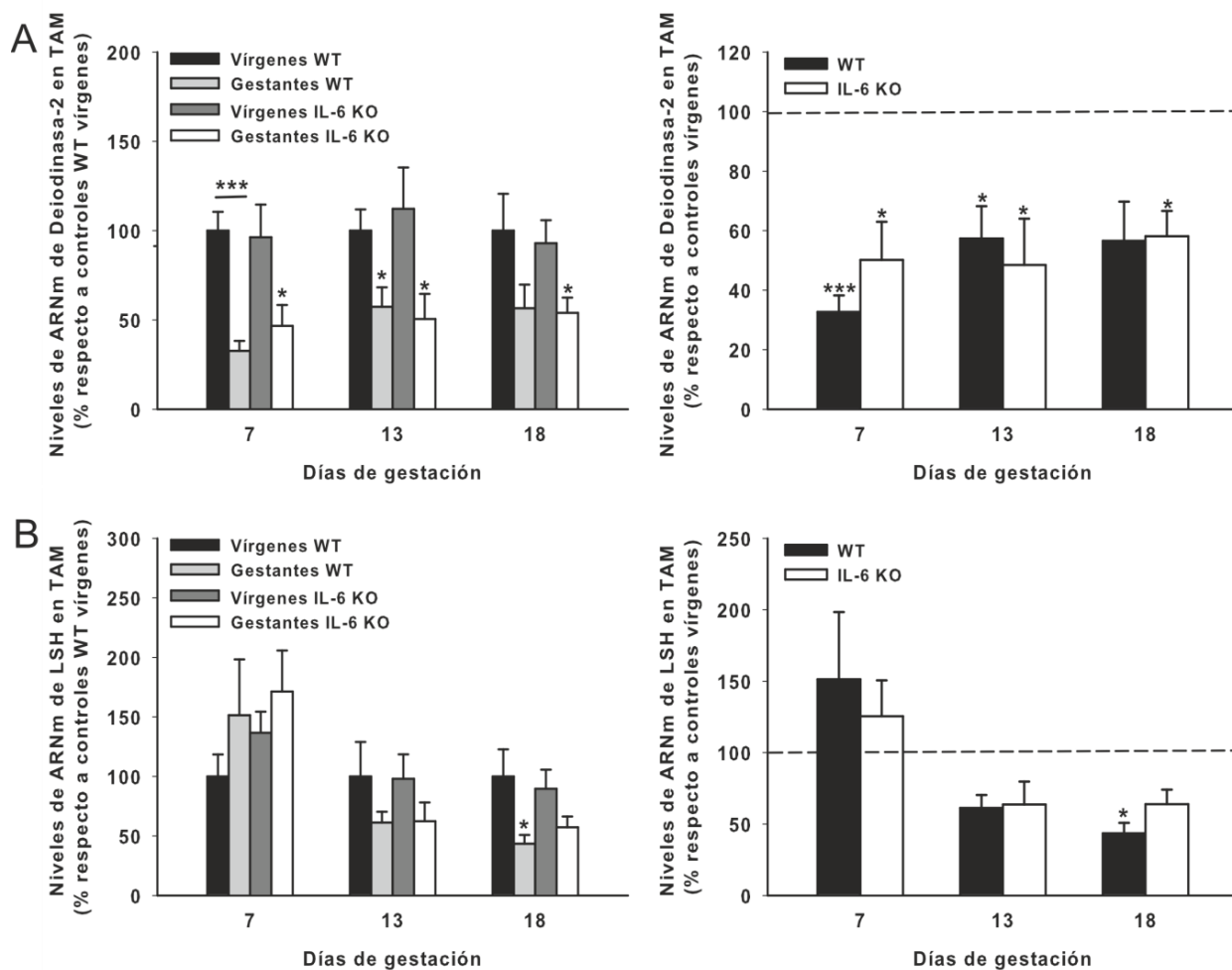


Figura 52. Niveles de ARNm de deiodinasa-2 y LSH en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Niveles de ARNm de deiodinasa; B) Niveles de ARNm de LSH. Panel izquierdo: valores respecto a control WT virgen y panel derecho: valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.1$, *** $P < 0.001$; $n = 5-8$ animales/grupo.

Como se mencionó con anterioridad la capacidad termogénica del TAM en una situación dada depende de su grado de diferenciación adipocitaria, su densidad mitocondrial y de la tasa de expresión de genes termogénicos como la proteína desacoplante UCP-1. Los distintos aspectos de ese proceso son modulados por el co-activador PGC-1 α (véase Fig.50 de esta sección y apartado 4.2.1.2. de la introducción) a través de su unión a distintos factores de transcripción mitocondriales, incrementando de esta manera la tasa de transcripción de genes implicados en el proceso de la biogénesis mitocondrial, la oxidación de ácidos grasos, la termogénesis y la respiración mitocondrial.

Uno de estos factores es PPAR γ que presenta lugares de unión en el promotor del gen de UCP-1, regulando de esta manera la expresión de esta proteína. A su vez, tanto la expresión de PPAR γ como la de su co-activador PGC-1 α son dependientes de los niveles de AMPc.

Tal y como se puede observar en la Fig. 53, nuestros resultados indican que la deficiencia de IL-6 no afecta a la expresión en el TAM de ambos factores en ninguno de los grupos de edad estudiados (es decir hembras vírgenes de 12-15 semanas de edad). Por el contrario, el contenido de ARNm de PGC-1 α en este tejido se reduce marcadamente durante los dos primeros tercios de la gestación en animales de ambos genotipos respecto a sus correspondientes controles vírgenes, no habiendo diferencias entre ratones gestantes WT e IL-6 KO (Fig. 53 A). Sin embargo, a los 18 días p.c. esta inhibición se revierte parcialmente en ausencia de IL-6, siendo los niveles de expresión de PGC-1 α en ratones IL-6 KO gestantes un 30% superiores a los observados en animales de genotipo salvaje en la misma fase de la gestación (Fig. 53 A).

En cuanto a los niveles de expresión de PPAR γ dicha inhibición es evidente únicamente en los dos últimos tercios de la gestación en ratones WT coincidiendo con el aumento de la expresión de IL-6 en este tejido. De tal manera que la deficiencia de esta citoquina en esta etapa de la gestación revierte este efecto inhibitorio sobre la transcripción del gen de PPAR γ (Fig. 53 B panel izquierdo).

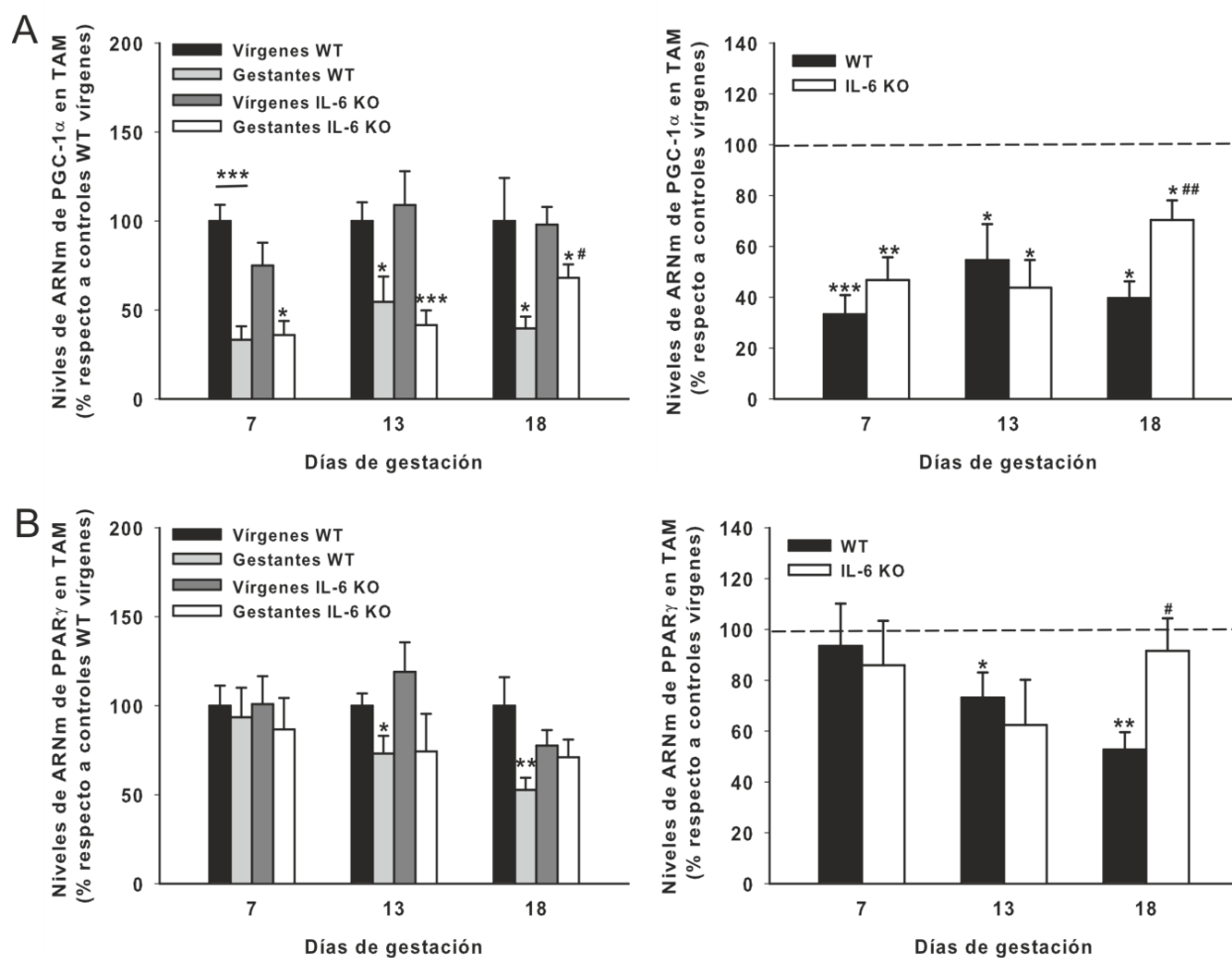


Figura 53. Niveles de ARNm de PGC-1 α y PPAR γ en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Niveles de ARNm de PGC-1 α ; B) Niveles de ARNm de PPAR γ . Panel izquierdo: valores respecto a control WT virgen y panel derecho: valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$ y ## $P < 0.01$; $n = 5-8$ animales/grupo

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos decidimos profundizar en el análisis del posible papel de IL-6 en la regulación de la función mitocondrial en este tejido durante la gestación. En este proceso juega un papel crucial un homólogo de PGC-1 α denominado PGC-1 β (véase Fig.50 de esta sección y apartado 4.2.2.1. de la introducción). Este co-activador ejerce funciones complementarias a PGC-1 α (599) y no es regulado transcripcionalmente por los niveles de AMPc. Al igual que su homólogo, PGC-1 β modula la expresión y la actividad de factores de transcripción mitocondriales como: NRF-1, que regula genes asociados a la cadena respiratoria; y ERR α , que regula genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y en la cadena de transporte electrónico. Sin embargo, el efecto modulador de PGC-1 β es ejercido principalmente sobre ERR α .

Nuevamente no hemos detectado diferencias en la expresión de PGC-1 β , NRF-1 o ERR α en el TAM entre hembras vírgenes de ambos genotipos (Fig.54 A panel izquierdo). No obstante, a los 13 días de gestación se produce un incremento de aproximadamente un 50% en los niveles de ARNm de este coactivador en ratones WT, que no se observaba en ratones IL-6 KO (Fig.54 A). En el grupo experimental correspondiente a la gestación a término, aunque no existían diferencias entre animales vírgenes y gestantes de ambos genotipos, los niveles de ARNm de PGC-1 β son significativamente superiores en ratones IL-6 KO gestantes respecto a los presentes en sus controles WT en el mismo estado reproductivo. Con respecto a NRF-1, nuestros datos indican que la expresión de este factor de transcripción sigue el mismo patrón que la de su co-activador PGC-1 β durante la gestación (Fig. 54 B panel izquierdo), incrementándose en la gestación intermedia en ambos genotipos, aunque este efecto es de menor magnitud en ausencia de IL-6 (Fig. 54 B panel derecho).

Por último en el caso de ERR α , el incremento de su transcripción era evidente ya a los 7 días de gestación, observándose del mismo modo en animales WT e IL-6 KO, lo que podría reflejar el efecto estimulador de los esteroides sexuales sobre la expresión de este factor de transcripción (600). Por el contrario a los 13 días de gestación este incremento desaparece en animales deficientes en IL-6. En resumen, estos resultados indican que IL-6 juega un papel crucial en la modulación de la función mitocondrial durante la gestación intermedia.

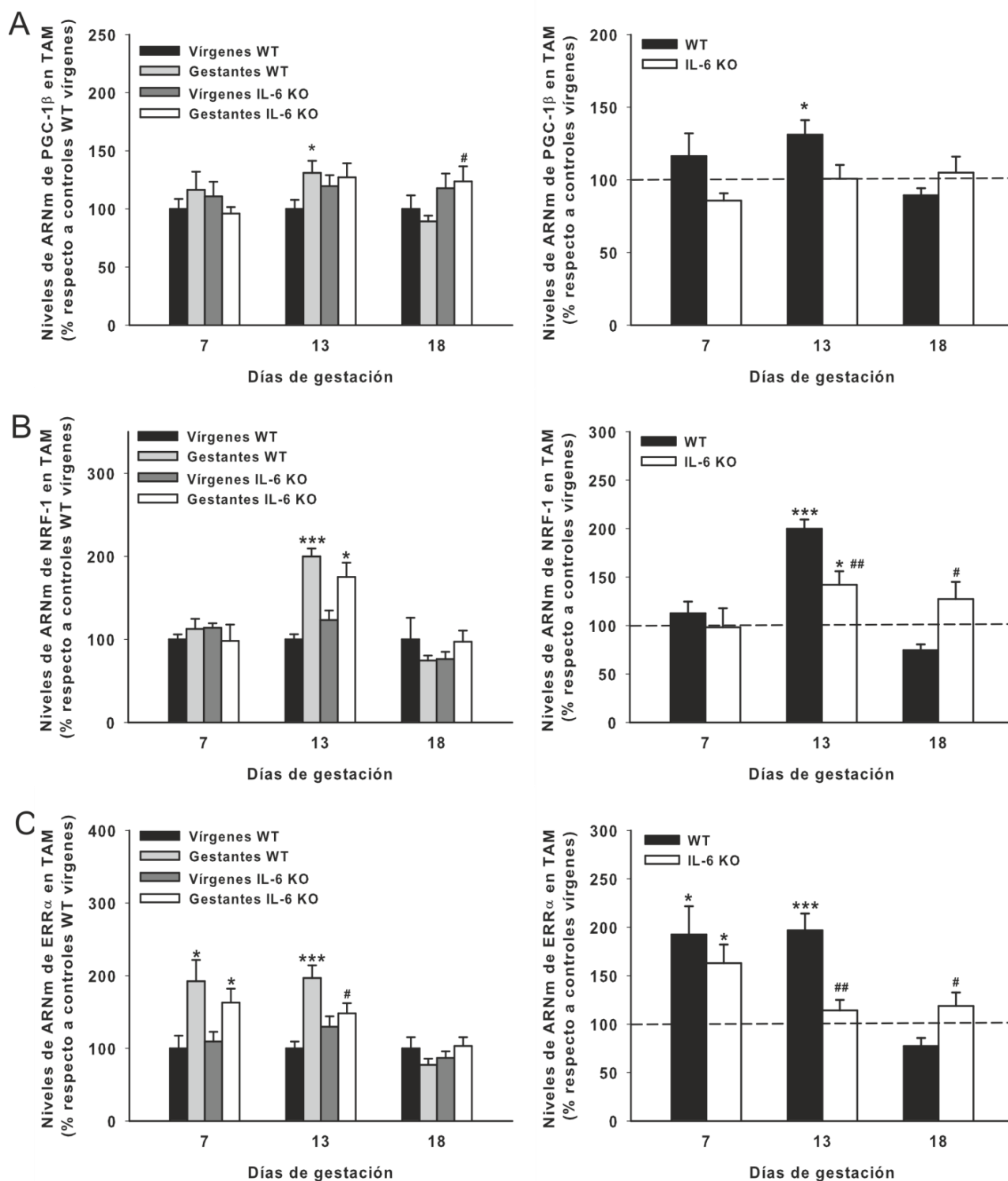


Figura 54. Niveles de ARNm de PGC-1 β , ERR α y NRF-1 en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Niveles de ARNm de PGC-1 β ; B) Niveles de ARNm de NRF-1 y C) Niveles de ARNm de ERR α . Panel izquierdo: valores respecto a controles WT vírgenes y panel derecho: valores respecto a controles vírgenes. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen *P<0.1, **P<0.01, *P<0.001 y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo #P<0.05, ##P<0.01; n=5-8 animales/grupo**

6.5. Efecto de la deficiencia de IL-6 sobre el gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora durante la gestación

Los resultados obtenidos en el estudio de la evolución de la capacidad termogénica del TAM durante la gestación, así como el mayor depósito graso en ratones IL-6 KO gestantes sugieren la ausencia de modulación del gasto energético durante este estado reproductivo en este modelo animal. Con el fin de comprobar la repercusión sobre el balance energético total de las alteraciones causadas durante la gestación en el programa termogénico a nivel del TAM por la deficiencia de IL-6, decidimos analizar el gasto energético de animales vírgenes y gestantes a los 7 y 13 días p.c., de ambos genotipos. Para ello se empleó un equipo integrado de calorimetría indirecta que suministra información continua de diferentes parámetros metabólicos y conductuales del animal, como el gasto energético, coeficiente respiratorio y la actividad locomotora, sin necesidad de alterar sus condiciones de estabulación. A pesar de que el diseño original de este experimento incluía un grupo de animales en la última etapa de la gestación (18 d.p.c.), la necesidad de un periodo de aclimatación a las jaulas metabólicas y la proximidad al momento del parto hizo imposible concluir esa parte del estudio.

Los resultados obtenidos en el análisis de gasto energético muestran que a los 7 días de gestación no se observan diferencias significativas, tanto cuando los resultados son corregidos en función del peso corporal como expresados en valor absoluto, entre animales vírgenes y gestantes en ninguno de los genotipos estudiados (Fig. 55 A y B), siendo además estos valores similares entre animales vírgenes de ambos genotipos. A los 13 días p.c., mientras que no se aprecian cambios en el gasto energético relativo al peso corporal entre ratones WT vírgenes y gestantes (Fig. 56 A panel izquierdo y B), la deficiencia de IL-6 induce una significativa reducción del mismo a lo largo de la fase nocturna del ciclo luz: oscuridad ($P=0.0167$ para IL-6 KO vírgenes vs IL-6 KO gestantes por ANOVA de muestras repetidas de doble vía; Fig. 56 A panel derecho). Así, el consumo energético promedio en ratones IL-6 KO gestantes durante esta fase es aproximadamente un 15% inferior al observado en animales vírgenes del mismo genotipo ($P<0.05$; Fig. 56 B). Cuando los resultados son expresados en valor absoluto, es decir sin corregir por peso corporal, lo que representa el consumo energético total del animal, podemos observar como la gestación en su etapa intermedia induce un significativo incremento del mismo a lo largo de la totalidad del ciclo luz: oscuridad (fase diurna: $P=0.0063$ y fase nocturna: $P=0.0298$ para WT vírgenes vs WT gestantes

por ANOVA de muestras repetidas de doble vía; Fig. 56 C panel izquierdo). Sin embargo, aunque la deficiencia de IL-6 no afecta este patrón de consumo energético durante la fase diurna, sí anula las diferencias existentes entre animales vírgenes y gestantes durante la fase nocturna del ciclo (fase diurna: $P=0.0004$ y fase nocturna: $P=0.2351$ para IL-6 KO vírgenes vs IL-6 KO gestantes por ANOVA de muestras repetidas de doble vía; Fig. 55 C panel derecho). De esta manera mientras que en ratones WT el promedio de gasto energético diurno y nocturno incrementa en un 20% en el día 13 de gestación, en animales deficientes de IL-6 esta elevación se observa únicamente en la fase diurna (Fig. 56 D).

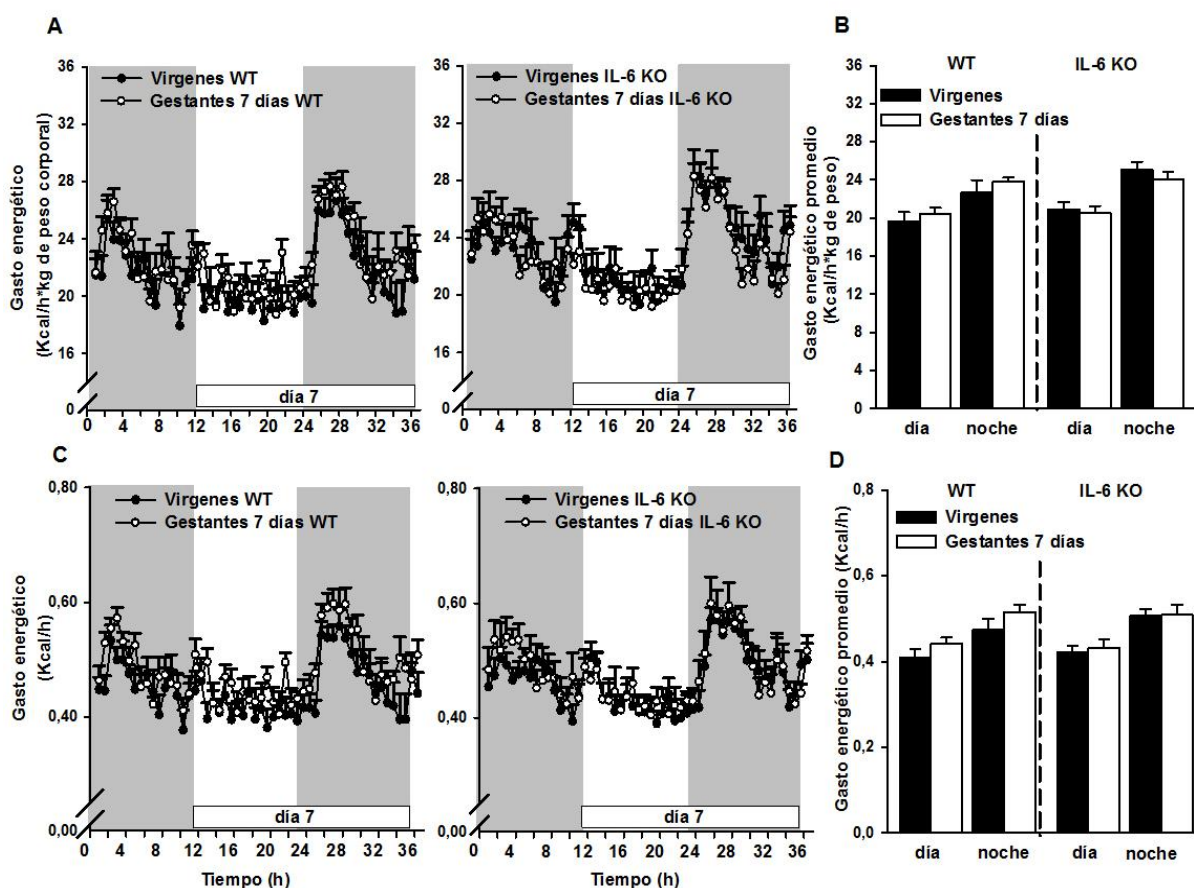


Figura 55. Gasto energético de animales WT e IL-6 KO a los 7 días de gestación. A) Evolución del gasto energético a largo del día 7 p.c. en ratones WT (panel izquierdo) e IL-6 KO (panel derecho), valores corregidos por peso corporal; B) Promedio de gasto energético durante la fase diurna y nocturna del ciclo luz: oscuridad; C) Evolución del gasto energético total a largo del día 7 p.c. en ratones WT (panel izquierdo) e IL-6 KO (panel derecho) y D) Promedio de gasto energético total durante la fase diurna y nocturna del ciclo diurno; $n=7-8$ animales/grupo.

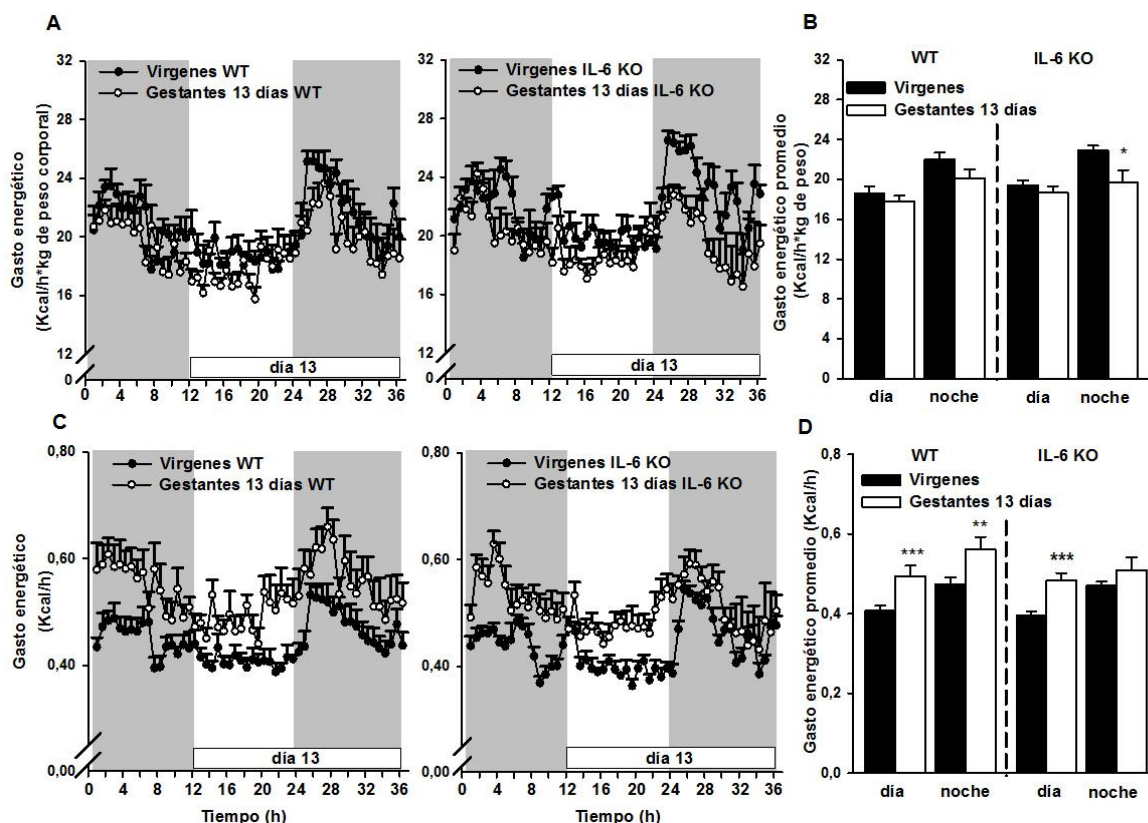


Figura 56. Gasto energético de animales WT e IL-6 KO a los 13 días de gestación. A) Evolución del gasto energético a largo del día 13 p.c. en ratones WT (panel izquierdo) e IL-6 KO (panel derecho), valores corregidos por peso corporal; B) Promedio de gasto energético durante la fase diurna y nocturna del ciclo luz: oscuridad; C) Evolución del gasto energético total a largo del día 13 p.c. en ratones WT (panel izquierdo) e IL-6 KO (panel derecho) y D) Promedio de gasto energético total durante la fase diurna y nocturna del ciclo diurno. Nivel de significación respecto a controles vírgenes * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.001$; $n = 7-8$ animales/grupo.

En cuanto al coeficiente respiratorio o RER, parámetro indicativo de la preferencia en la utilización de sustratos energéticos (carbohidratos frente a grasa o viceversa), no se observan variaciones en sus niveles entre animales vírgenes y gestantes de ambos genotipos a lo largo del día 7 p.c. (Fig. 57 A y B). Este perfil se mantiene a lo largo de la fase diurna del ciclo luz: oscuridad en el día 13 de gestación (Fig. 57 C y D), mientras que aunque se observa una ligera disminución del mismo en ratones IL-6 KO gestantes en las últimas horas de la fase nocturna ésta no alcanza significación estadística (fase nocturna: $P = 0.0877$ para IL-6 KO vírgenes vs. IL-6 KO gestantes por ANOVA de muestras repetidas de doble vía; (Fig. 57 C, panel derecho). Esta reducción en los valores del RER estaría asociada al inicio de la fase catabólica de la gestación (en la que se utilizan preferentemente grasas frente a carbohidratos como fuente de energía. Para

establecer la existencia de diferencias entre genotipos en la utilización de sustratos metabólicos sería necesario el análisis de puntos temporales posteriores en la gestación.

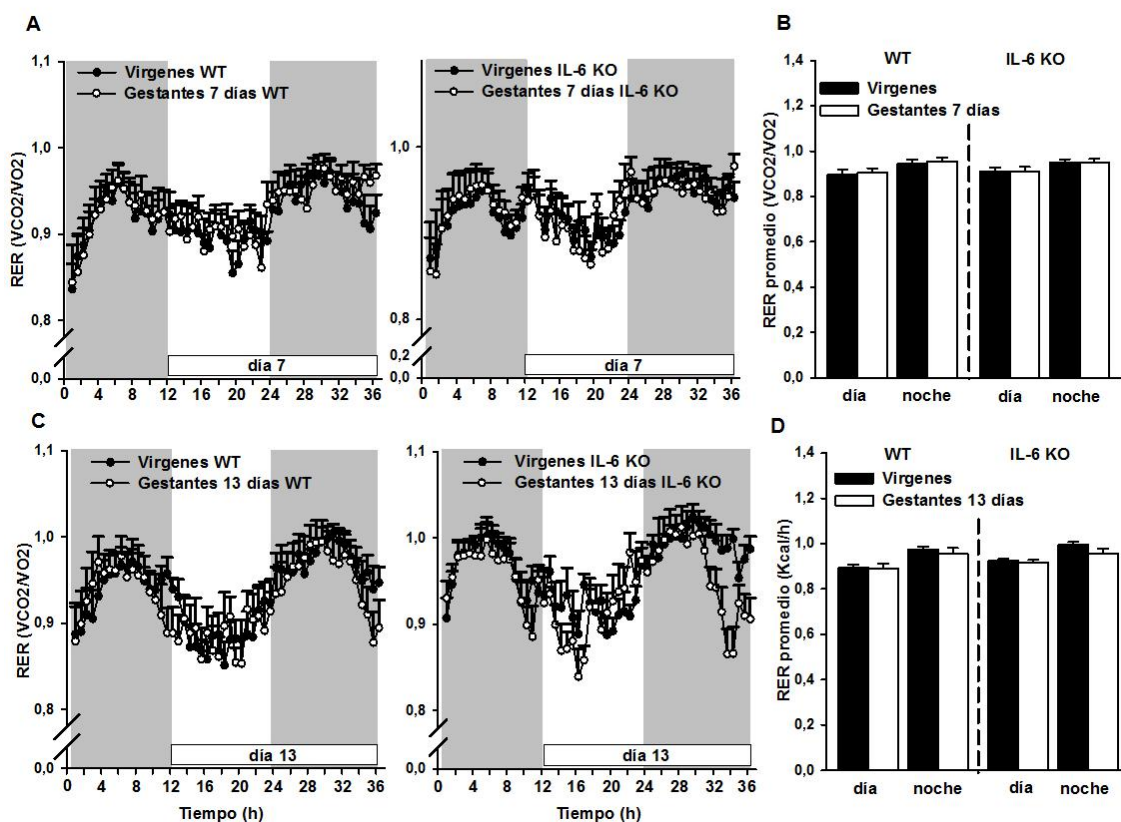


Figura 57. Coeficiente respiratorio (RER) en animales WT e IL-6 KO a los 7 y 13 días de gestación. A) Evolución del RER a lo largo del día 7 p.c. en ratones WT (panel izquierdo) e IL-6 KO (panel derecho) ; B) Promedio del RER a los 7 días de gestación; C) Evolución del RER a lo largo del día 13 p.c. en ratones WT (panel izquierdo) e IL-6 KO (panel derecho); D) Promedio del RER a los 13 días de gestación; n = 7-8 animales/grupo.

Por otro lado, en este trabajo también se ha analizado el efecto de la deficiencia de IL-6 sobre la actividad locomotora durante la gestación. Como se mencionó en la introducción de esta tesis (introducción, apartado 5.1) en este estado fisiológico tienen lugar profundas adaptaciones conductuales, siendo quizás las más llamativas las relativas a la conducta alimentaria. La ingesta de alimentos como todo comportamiento motivado incluye dos fases o componentes: la fase anticipatoria, también denominada apetitiva o preparatoria, destinada a la obtención de una recompensa, que incluye comportamientos como la exploración del entorno en la búsqueda de alimentos y el acaparamiento de los mismos; y una fase de consumación que conduce a la obtención final de la recompensa, que incluye comportamientos como la ingesta de alimentos o bebidas (601). Así, se ha descrito que el efecto de la gestación sobre el comportamiento alimenticio se extiende no sólo a la fase de consumación, incrementándose

marcadamente la tasa de ingesta, sino también a la fase anticipativa de tal manera que comportamientos como el acaparamiento de alimentos y la actividad exploratoria se acrecientan en este estado fisiológico (602).

En este contexto nuestros resultados muestran que a los 7 días de gestación, se produce un significativo incremento de la actividad locomotora total a lo largo de la fase nocturna del ciclo luz: oscuridad, coincidiendo con el periodo de máxima ingesta de alimentos (fase nocturna: $P=0.0070$ para WT vírgenes vs WT gestantes por ANOVA de muestras repetidas de doble vía; Fig. 58 A panel izquierdo). Esta elevación de la actividad locomotora es debida fundamentalmente a un incremento de la actividad física espontánea y la actividad de alta frecuencia (correspondiente a los movimientos respiratorios), que son un 30 y un 25% superiores a las observadas en los ratones control virgen (Fig. 58 D y F). La deficiencia en IL-6, sin embargo, no afectaba ni a la actividad ambulatoria total, ni a ninguno de sus componentes (actividad espontánea, de alta frecuencia o movimientos verticales; Fig. 58 B, D y E). Por el contrario, aunque tampoco se observaron diferencias entre ratones gestantes de ambos genotipos ni en la actividad total, ni en los movimientos en el plano horizontal a lo largo de la fase nocturna (Fig. 58 A-F) del día 7 de gestación, si detectamos un marcado incremento de la cantidad de movimientos verticales en ratones IL-6 KO gestantes respecto a las hembras vírgenes de ambos genotipos (número de interrupciones del haz Z: vírgenes WT = 3052 ± 262 ; vírgenes IL-6 KO = 3798 ± 615 ; Gestantes IL-6 KO = 9393.833 ± 751 ; $P < 0.05$). Este incremento en la actividad vertical podría estar asociado al aumento de la tasa de ingesta observado en los ratones IL-6 KO a lo largo de esta primera etapa de la gestación (0-7 días p.c., resultados, apartado 2).

Por último a los 13 días de gestación, el perfil de actividad locomotora total y en el plano horizontal es ligeramente diferente. Así, el incremento observado en ambos parámetros en hembras gestantes se adelanta a las cuatro últimas horas de la fase diurna del ciclo luz: oscuridad (Fig. 59 A, C y E), mientras que no existen diferencias entre ratones vírgenes y gestantes de ambos genotipos a lo largo de la fase nocturna (Fig. 59 B, D y F). Esta ampliación de la franja de actividad diaria podría estar relacionada con el aumento de los movimientos anticipativos en la búsqueda de alimentos asociado a este estado fisiológico. Curiosamente este efecto no se observa en el caso de la actividad en el eje vertical en ratones WT gestantes aunque si en el caso de los ratones deficientes en IL-6 (Fig. 59 G y H).

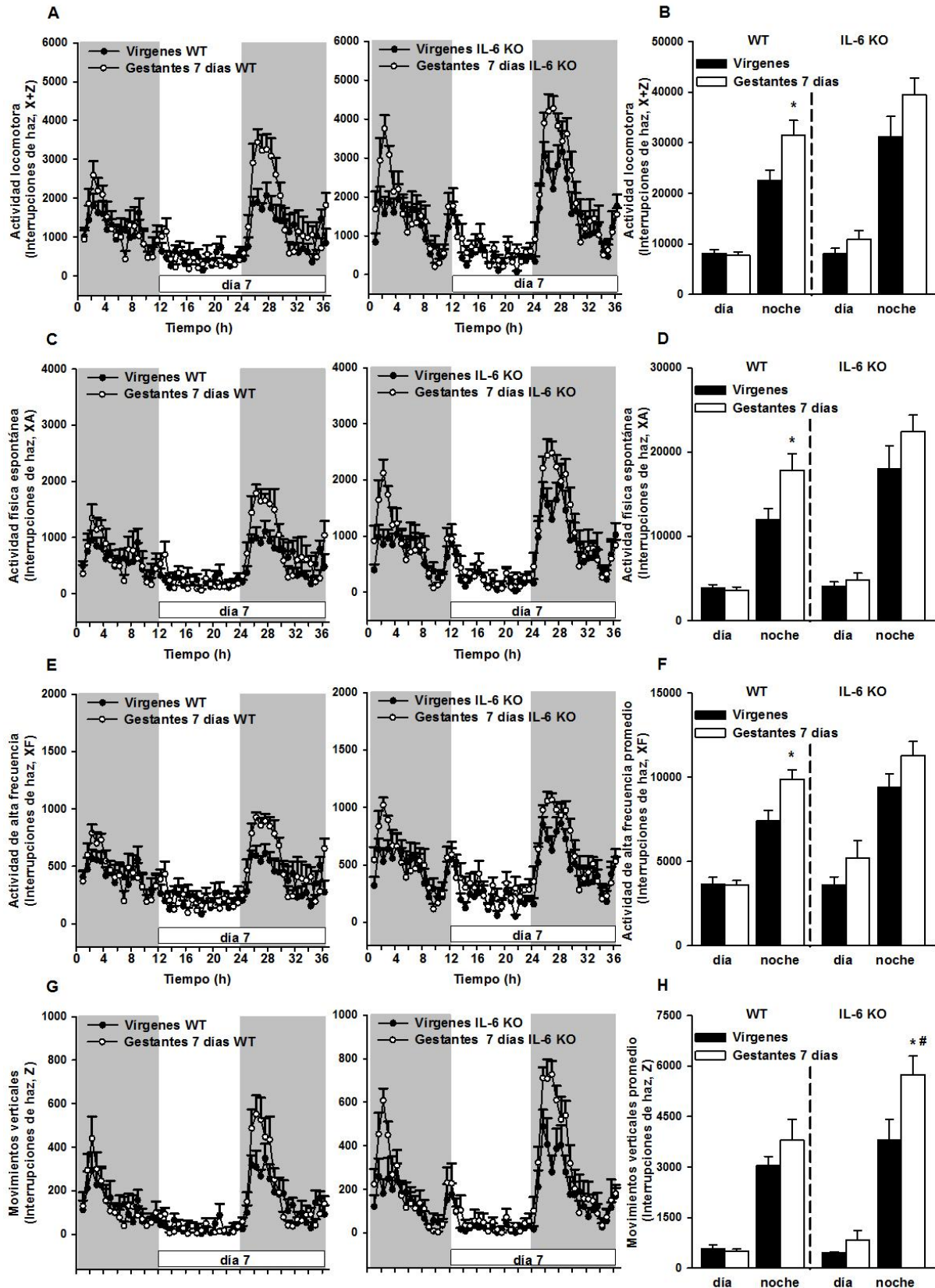


Figura 58. Actividad locomotora en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6KO) en el día 7 de gestación. Evolución temporal y valor total de: A y B) Actividad locomotora total; C y D) Actividad espontánea; E y F) Actividad de alta frecuencia (respiración) y G y H) Movimiento vertical a lo largo del día 13 de gestación en ratones WT (panel izquierdo) e IL-6 KO (derecho). Nivel de significación respecto a controles vírgenes * $P < 0.05$ y respecto animales control WT virgen en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$; $n = 7-8$ animales/grupo.

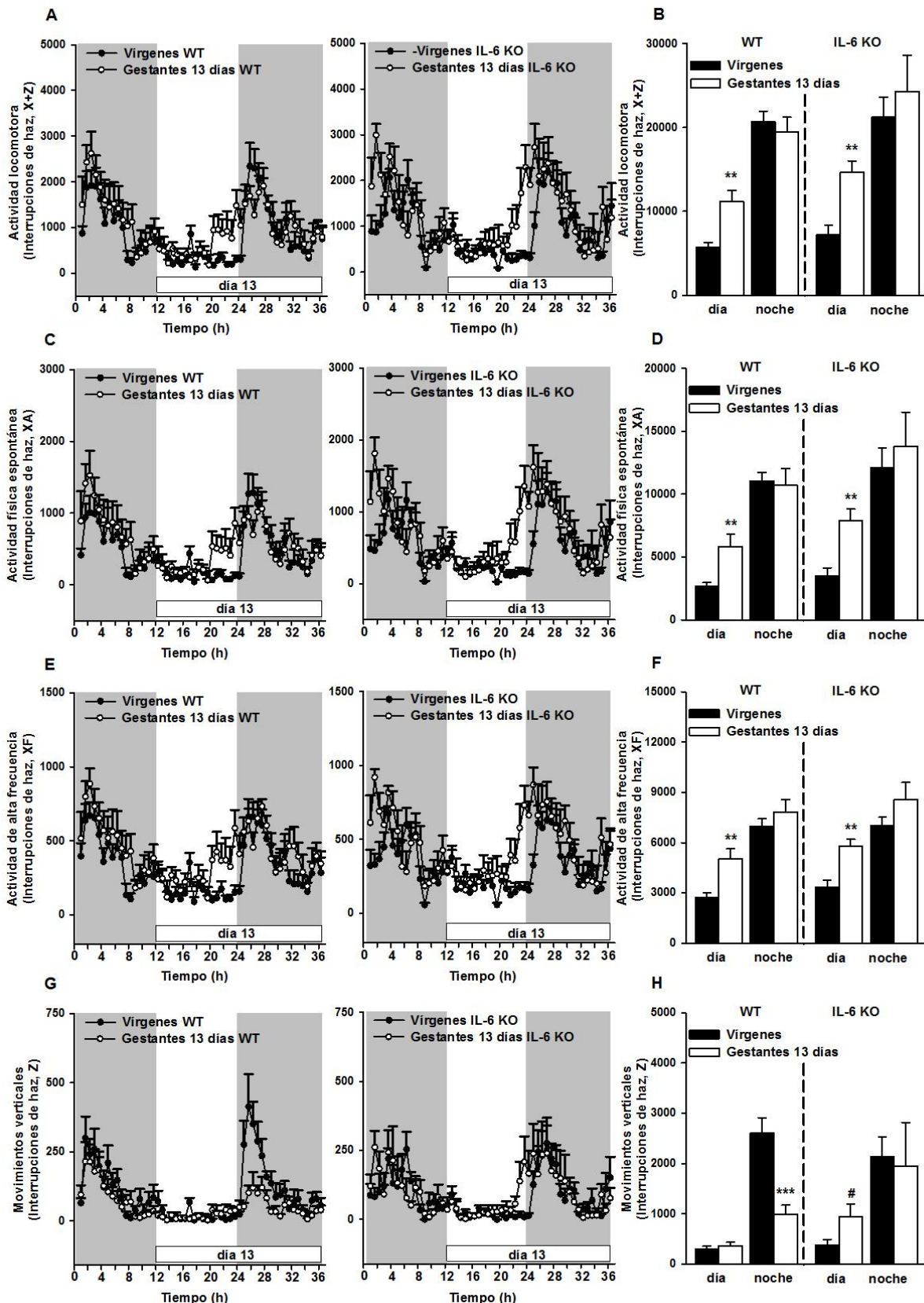


Figura 59. Actividad locomotora en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6KO) a los 13 días de gestación. Evolución temporal y valor total de: A y B) Actividad locomotora total; C y D) Actividad espontánea; E y F) Actividad de alta frecuencia (respiración) y G y H) Movimiento vertical a lo largo del día 13 de gestación en ratones WT (panel izquierdo) e IL-6 KO (derecho). Nivel de significación respecto a controles vírgenes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y respecto animales control WT virgen en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$; $n = 7-8$ animales/grupo.

6. 6. Evolución del peso del TAM durante la lactancia.

A diferencia de lo descrito en el caso la rata, en la que tras el parto el TAM interescapular sufre un proceso de progresiva involución; en el ratón durante la lactancia, el tamaño de este tejido se mantiene elevado, aunque su contenido proteico y su capacidad termogénica disminuye a lo largo de este periodo (560). Por ello, y con el fin de evaluar la posible implicación de IL-6 en el proceso de atrofia funcional de este tejido, analizamos el peso del TAM en animales WT y deficientes en IL-6 tanto al inicio como durante la lactancia intermedia (7 y 14 días p.p.)

Nuestros resultados indican que la lactancia temprana no afecta al peso del TAM en los animales WT ni en los deficientes en IL-6. Sin embargo, 14 días tras el parto el peso de este depósito graso se muestra marcadamente elevado, no observándose diferencias entre genotipos ni cuando los resultados son expresados en valor absoluto ni corregido por peso corporal (Fig.60). Por tanto la ausencia de IL-6 parece no afectar al proceso de atrofia característico de este tejido durante la lactancia

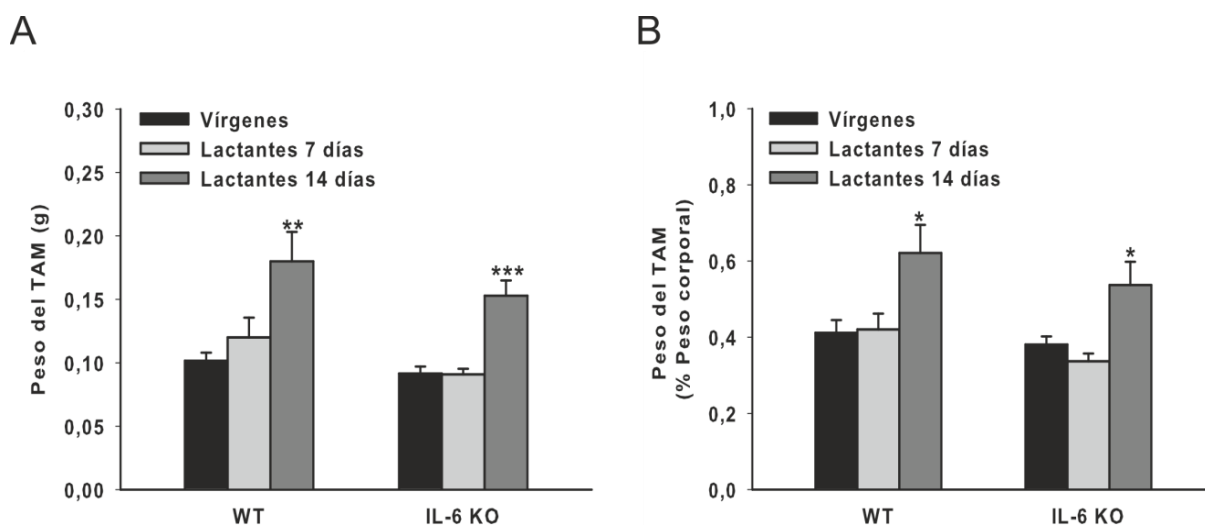


Figura 60. Evolución del peso del tejido adiposo marrón interescapular en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Peso fresco del tejido adiposo marrón interescapular. B) Valores corregidos por peso corporal. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen *P<0.05, **P<0.01, *P<0.001; n=7-12 animales/grupo.**

6. 7. Expresión de IL-6 y su receptor IL-6R α en TAM durante la lactancia.

A continuación, procediendo igual que en el caso del estudio correspondiente a la etapa de la gestación, se evaluaron los niveles de ARNm de IL-6 y su receptor. Nuestros resultados indican que, a nivel de este tejido no existen cambios en la expresión de esta citoquina y su receptor en ninguna de las fases de la lactancia estudiadas ni entre genotipos (Fig. 61).

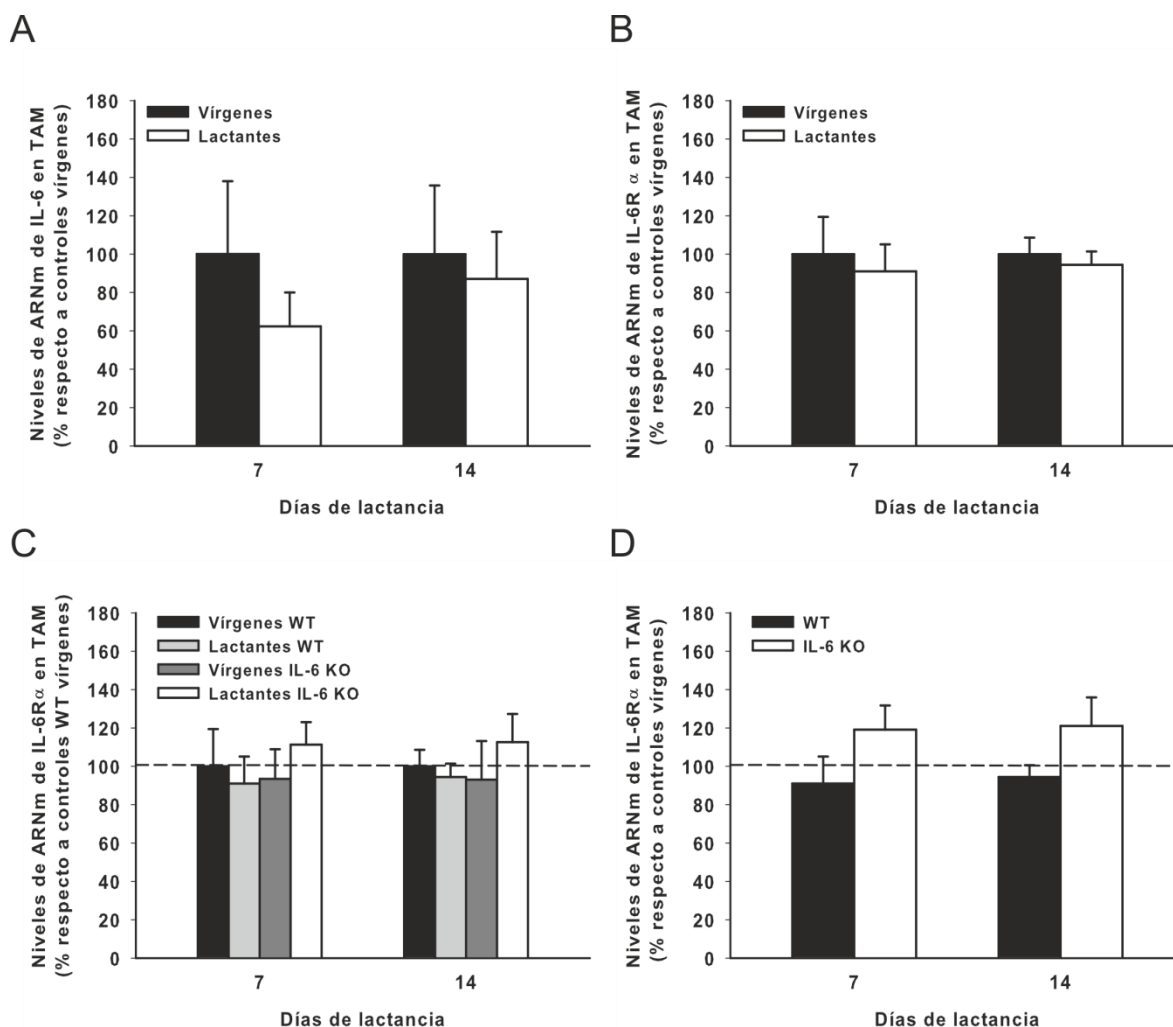


Figura 61. A) Niveles de ARNm de IL-6 y B) de IL-6R α en ratones WT durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). Niveles de ARNm de IL-6R α a los 7 y 14 días de lactancia en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO), C) valores respecto a controles WT vírgenes y D) valores respecto a controles vírgenes de cada genotipo; n=6-8 animales/grupo

6. 8. Efecto de IL-6 sobre la capacidad termogénica del TAM durante la lactancia: perfil de expresión génica de UCP-1 y UCP-3 en TAM durante la lactancia

Dada la similitud del peso del TAM entre ratones hembra de ambos genotipos y, la ausencia de modulación de la expresión en este tejido de IL-6 y su receptor durante la lactancia; decidimos estudiar la expresión de las proteínas UCP-1 y UCP-3 en TAM durante este estado fisiológico. Como ya se indicó con anterioridad, UCP-1, además de ser un elemento clave en el proceso de desacoplamiento mitocondrial, puede considerarse como un marcador del grado de diferenciación del tejido adiposo marrón.

Los resultados de este estudio indican que desde el inicio de la lactancia se observa un descenso significativo de los niveles de ARNm de UCP-1 en ratones lactantes de ambos genotipos respecto a sus controles vírgenes, de acuerdo con la inhibición de la termogénesis adaptativa característica de este estado fisiológico (Fig. 62 A). La ausencia de IL-6 parece no afectar a la ya de por sí inhibida capacidad termogénica del TAM durante la lactancia, siendo la reducción de los niveles de ARNm de esta proteína similar en los animales de genotipo salvaje y en los ratones IL-6 KO tanto a los 7 como a los 14 días p.p. (Fig. 62 B), cuando los niveles de UCP-1 son prácticamente indetectables (porcentaje respecto a los niveles en ratones WT virgen: Gestantes WT= $4.086 \pm 2.105\%$ y Gestantes IL-6 KO= $3.826 \pm 1.312\%$; $P < 0.001$; Fig. 62 A).

En el caso de UCP-3, su expresión durante la lactancia en el TAM sigue el mismo patrón que el descrito para UCP-1, no habiendo de nuevo diferencias entre ratones lactantes de ambos genotipos (Fig. 63).

Teniendo en cuenta la ausencia de efecto de la deficiencia de IL-6 sobre todos los parámetros relacionados con la capacidad termogénica del TAM durante la lactancia, no se ha estudiado en más detalle la evolución en nuestro modelo a lo largo de este periodo de marcadores de biogénesis mitocondrial.

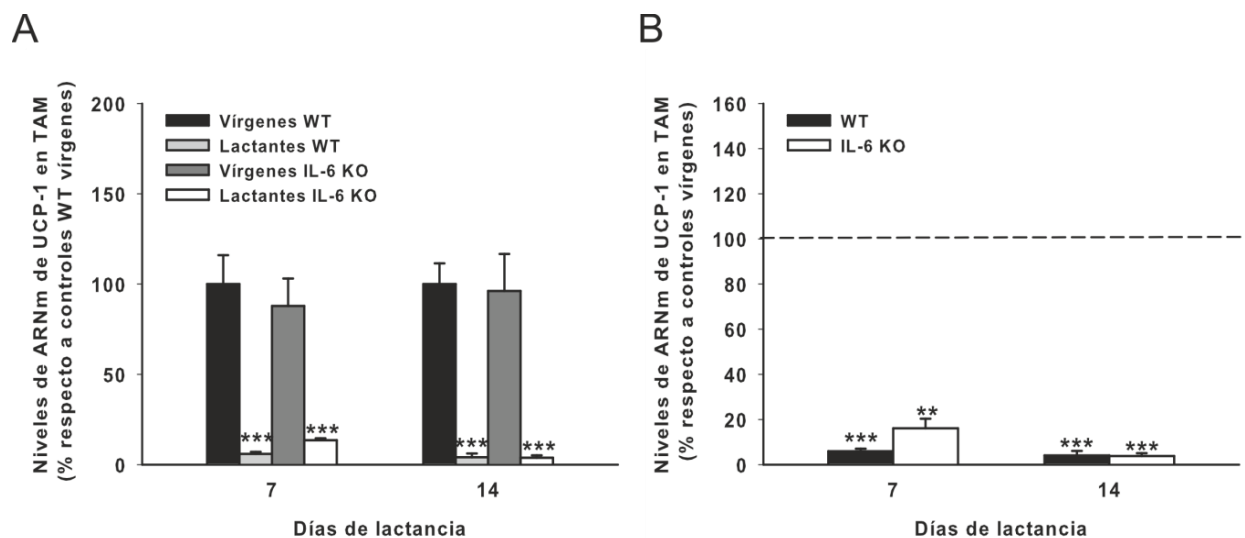


Figura 62. Niveles de ARNm de UCP-1 en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 7-8$ animales/grupo.

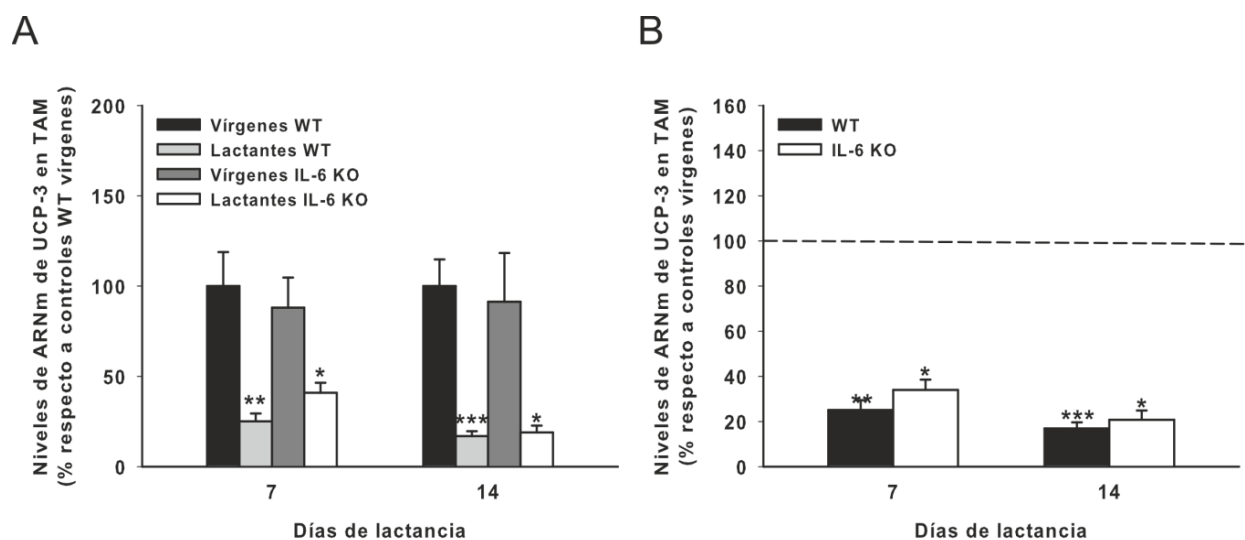


Figura 63. Niveles de ARNm de UCP-3 en TAM en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Valores respecto a control WT virgen. B) Valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 7-8$ animales/grupo.

7. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 SOBRE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO LÍPIDICO EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO (TAB) Y EL HÍGADO DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA.

Los resultados de composición corporal que muestran la presencia de un mayor acúmulo lipídico en el modelo de ratones deficientes en IL-6, tanto en la gestación como durante la lactancia, sugieren la existencia de un metabolismo lipídico alterado en el modelo de ratones deficientes en IL-6 a lo largo del ciclo reproductivo. Por ello a continuación decidimos analizar el papel de IL-6 en las adaptaciones que tienen lugar en la expresión de las enzimas implicadas en la captación, utilización y/o depósito de lípidos a lo largo de ambos estados fisiológicos, centrando nuestro interés en los dos principales órganos con capacidad lipogénica: el tejido adiposo blanco y el hígado. Comenzaremos describiendo los datos referentes al metabolismo en el tejido adiposo blanco durante la gestación, continuando con el estudio de la lactancia, para finalmente concluir siguiendo el mismo esquema con el análisis correspondiente al metabolismo hepático.

7.1. Metabolismo lipídico en el TAB durante la gestación

7.1.1. Expresión de IL-6 en el TAB durante la gestación.

En primer lugar, y con el fin de comprobar si el incremento en los niveles circulantes de IL-6 durante la gestación se correlaciona con la producción de esta citoquina en el TAB, al igual que ocurre en la obesidad, analizamos su patrón de expresión durante este estado fisiológico.

Nuestros resultados indican que los niveles de ARNm de IL-6 se incrementan a los 13 días de gestación, triplicando los valores de los animales no gestantes, y permanecen elevados hasta el final del periodo gestacional (Fig. 64).

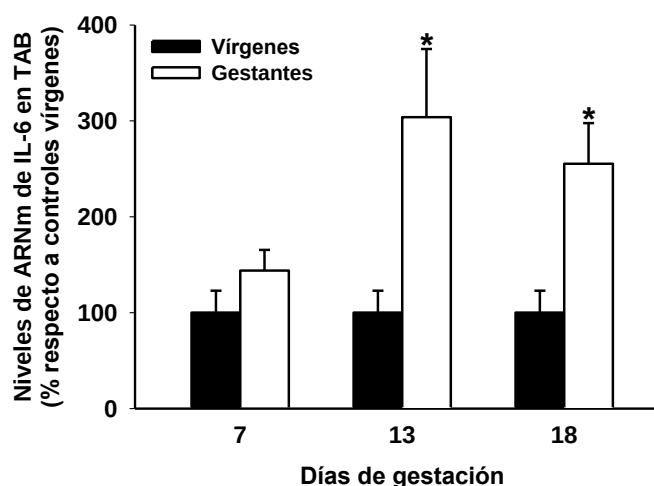


Figura 64. Niveles de ARNm de IL-6 en el TAB durante la gestación. Nivel de significación respecto a los controles vírgenes * $P < 0.05$; $n = 8$ animales/grupo.

7.1.2. Efecto de IL-6 sobre la expresión en el TAB de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico durante la gestación.

Basándonos en el perfil de expresión de IL-6 en este tejido durante el periodo gestacional, a continuación analizamos la influencia de la ausencia de la producción endógena de esta citoquina sobre la expresión de enzimas asociadas a distintas rutas del metabolismo lipídico (captación y síntesis de triglicéridos, lipólisis así como también síntesis y oxidación de ácidos grasos) en el TAB abdominal de ratones hembra vírgenes y gestantes de ambos genotipos.

7.1.2.1. Captación de ácidos grasos y movilización (lipólisis) de triglicéridos

La lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa sensible a hormonas (LSH) son dos enzimas clave en el proceso de almacenamiento y movilización de lípidos (véase de introducción apartado 4.2.2.). LPL es sintetizada en las células parenquimales de la mayoría de los tejidos del organismo y es transportada a su lugar de acción en el endotelio capilar, donde se encarga de hidrolizar los triglicéridos contenidos en los quilomicrones y en las proteínas de baja densidad VLDL. Su actividad es especialmente relevante en el tejido adiposo, donde juega un papel esencial en la regulación del almacenamiento de triglicéridos. Por el contrario, LSH cataliza la reacción limitante del proceso de lipólisis en este tejido, regulando de esta manera la hidrólisis de los triglicéridos almacenados en el mismo. La expresión transcripcional de ambas enzimas en el TAB, al menos en la

rata (476), presenta un perfil de cambio característico a lo largo de la gestación. De esta manera, los niveles de ARNm de LPL comienzan a disminuir en la gestación intermedia, siendo prácticamente indetectables en la gestación a término. Por el contrario la expresión de LSH alcanza sus niveles máximos en la segunda semana de gestación, retornando a los basales en los días previos al parto. En base a esta evolución a lo largo de la gestación, la relación LSH/LPL, que se ha considerado como un indicativo de la tasa de movilización frente al almacenamiento de grasas, también presenta un patón gestacional específico. Así, ésta comienza a elevarse a partir de la mitad de la gestación alcanzando sus valores máximos el último día de la misma.

A este respecto, nuestros resultados indican que la expresión de LPL en el TAB sufre una marcada estimulación al inicio de la gestación alcanzando aproximadamente el doble de los valores observados en los controles vírgenes. Esta estimulación coincide temporalmente con el periodo de mayor acúmulo de grasa abdominal en la madre gestante. Sin embargo, en la gestación intermedia los niveles de ARNm de LPL se reducen significativamente contribuyendo de esta manera a la redirección de lípidos circulantes hacia otros tejidos maternos. Finalmente en la última etapa de la gestación, a diferencia de lo descrito en el caso de la rata, la expresión de LPL en el TAB murino retorna a los valores observados en animales no gestantes (Fig. 65 A).

En cuanto a la expresión de la enzima LSH observamos que ésta aumenta progresivamente durante la gestación, siendo sus niveles significativamente superiores a los de los controles vírgenes tanto a los 13 como a los 18 días de gestación (Fig. 65 B), favoreciendo de esta manera la movilización y utilización de las reservas grasas alcanzadas en la fase anabólica de la gestación. Reflejando este perfil de cambio en la expresión de ambas enzimas, la relación LSH/LPL se reduce de forma significativa a los 7 días p.c., para luego aumentar drásticamente en la gestación intermedia (Fig. 65 C) coincidiendo con el inicio de la etapa catabólica de la preñez en el ratón. Sin embargo a diferencia del caso de la rata, lejos de mantenerse elevada esta relación retorna a los valores basales en los días previos al parto (Fig. 65 C).

En cuanto al efecto de IL-6 sobre la expresión de ambas enzimas y su relación, nuestros datos indican que, aunque no existen diferencias entre ratones no gestantes de ambos genotipos en dichos parámetros, la ausencia de IL-6 endógena tiene un profundo impacto en la tasa de movilización de triglicéridos en la segunda mitad de la gestación, afectando en menor medida a la captación de los mismos a los 13 días p.c. (Fig. 65 A y B). De esta manera, aunque en este punto temporal de la gestación la expresión de LPL se reduce de igual manera en ratones de ambos genotipos, los niveles de ARNm de esta enzima son significativamente superiores en los ratones IL-6 KO gestantes respecto a sus controles WT en el mismo estado reproductivo. Por otro lado, la estimulación de la expresión de LSH característica de los últimos tercios de la gestación es anulada por la deficiencia de IL-6 endógena. Del mismo modo, este efecto se observa al analizar la relación entre la tasa de expresión de estas dos enzimas, que en ausencia de IL-6, se mantiene invariable a lo largo de la gestación (Fig. 65 C)

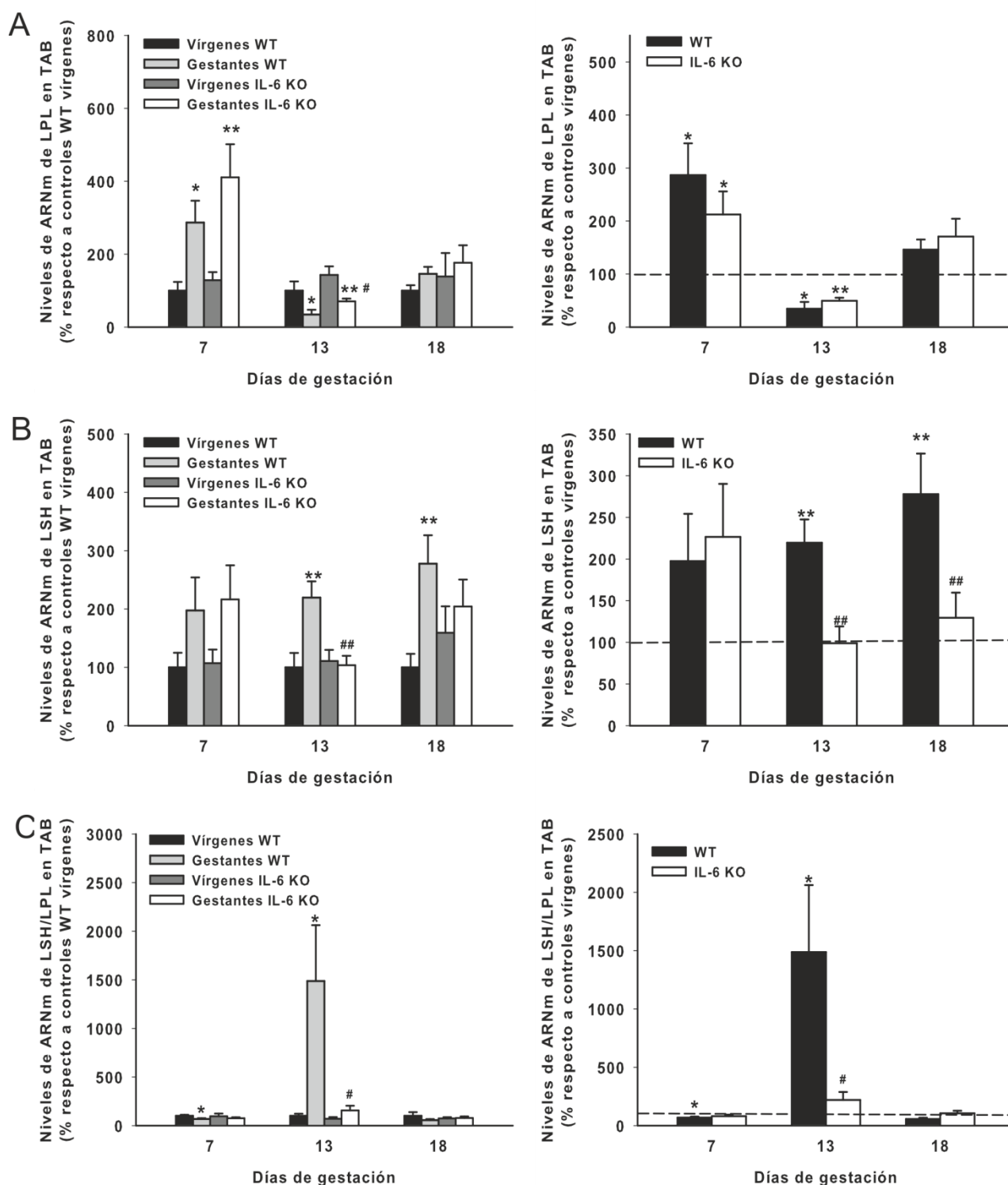


Figura 65. Niveles de ARNm de LPL y LSH en TAB en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Niveles de ARNm de LPL; B) Niveles de ARNm de LSH; C) Relación entre niveles de ARNm de LSH/LPL. Panel izquierdo: valores respecto a control WT virgen y panel derecho: valores respecto a control virgen. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 5-8$ animales/grupo.

7.1.2.2. Síntesis de *novo* y oxidación de ácidos grasos

Las alteraciones en el metabolismo lipídico que tienen lugar durante la gestación y en mayor medida durante la lactancia son mediadas principalmente por cambios en la expresión transcripcional de enzimas clave en los procesos de síntesis de novo de ácidos grasos así como en su oxidación: ACC, FAS y CPT-1 α , respectivamente (603,604). Por tanto en este trabajo se ha analizado el efecto de la ausencia de IL-6 sobre los niveles de ARNm de estas enzimas en el TAB a lo largo de la gestación

Tal y como se puede observar en la Fig. 66, aunque a los 7 días p.c. la tasa de expresión de estas tres enzimas permanece inalterada a nivel del TAB abdominal, sin embargo al inicio de la fase catabólica (13 días p.c.) se observa una tendencia hacia una reducción en la expresión de enzimas lipogénicas, ACC-1, que alcanza significación positiva únicamente en el caso de la sintasa de ácidos grasos (FAS). Ya en la gestación a término, mientras que los niveles de ARNm de ambas enzimas son similares entre ratones vírgenes y gestantes, la expresión de la enzima oxidativa CPT-1 α prácticamente se duplica (porcentaje de ARNm respecto a los niveles en ratones WT virgen: Gestantes WT= 199.23 $\pm$ 17.30%, $P < 0.01$; Fig. 66 C).

Aunque de nuevo no hemos detectado diferencias en el contenido de ARNm de estas tres enzimas en el TAB de ratones vírgenes WT e IL-6 KO, la deficiencia de IL-6 durante la gestación temprana favorece un incremento de la lipogénesis durante los dos primeros tercios de la gestación e inhibe la oxidación de las reservas grasas en su última etapa. La ausencia de esta citoquina en el ratón provoca una estimulación de la transcripción génica de ACC-1 y FAS, a los 7 días de gestación, mientras que bloquea la modulación de la expresión de FAS y CPT-1 α en los 13 y 18 días p.c., respectivamente (Fig. 66 A y B).

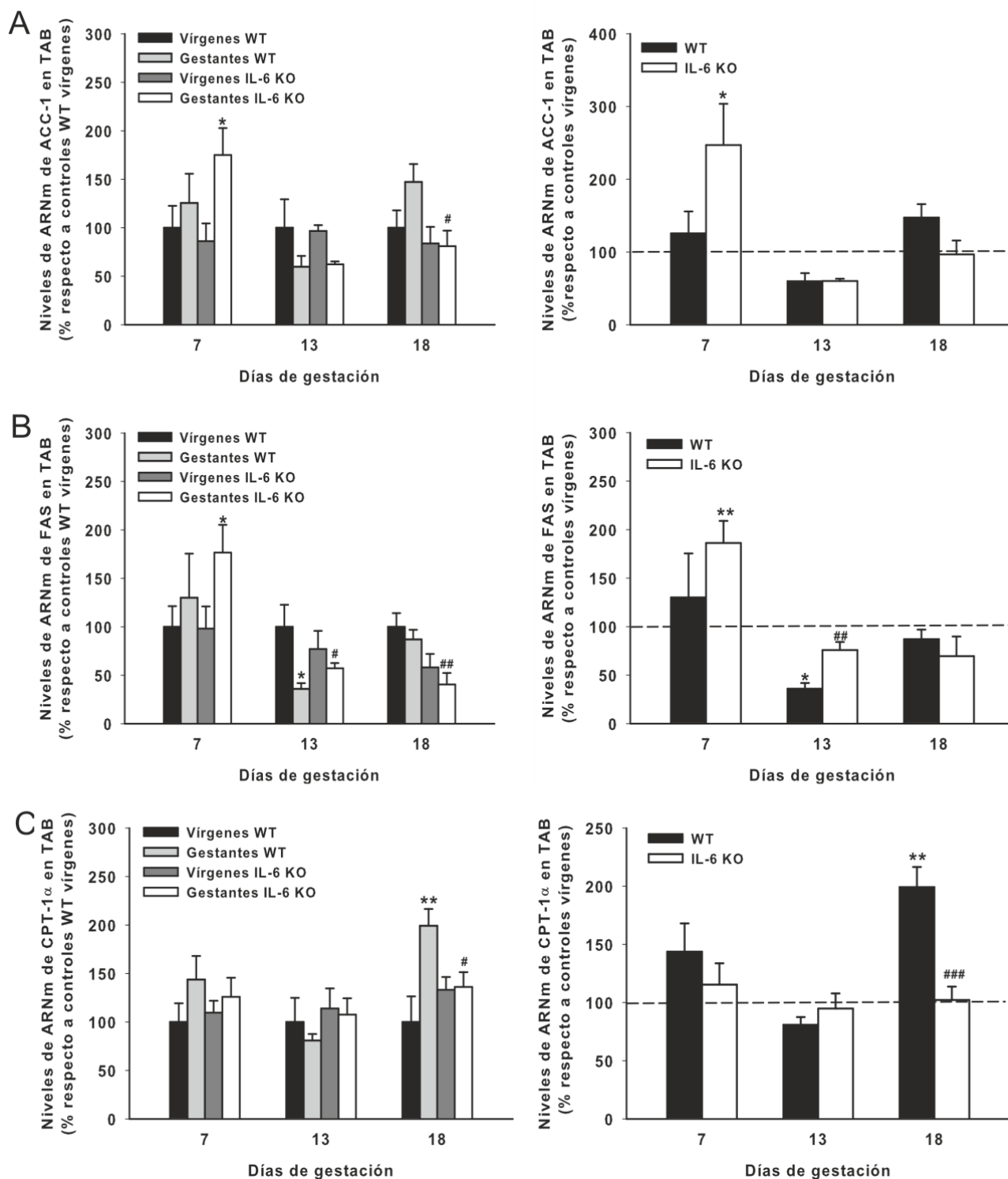


Figura 66. Niveles de ARNm de ACC, FAS y CPT-1 α en el TAB en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7,13 y 18 días p.c.). A) Expresión de ACC, B) Expresión de FAS, C) Expresión de CPT-1 α . Panel izquierdo, valores respecto a controles WT, panel derecho, valores respecto a controles vírgenes. Nivel de significación respecto a controles vírgenes correspondientes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y respecto a controles WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$; $n = 7-8$ animales/grupo.

7.2. Metabolismo lipídico en el TAB durante la lactancia.

7.2.1. Expresión de IL-6 en el TAB durante la lactancia.

Aunque existen abundantes datos en la bibliografía (435) acerca del perfil de producción de IL-6 en el TAB durante la gestación estos estudios se interrumpen siempre en los primeros días tras el parto. Por tanto, y teniendo en cuenta la marcada movilización de las reservas grasas característica de la lactancia, iniciamos esta parte experimental de la presente tesis, analizando en este tejido los niveles de ARNm de IL-6 en ratones a los 7 y 14 días p.p.

A pesar de que, transcurridos 7 días tras el parto todavía se observan unos niveles de expresión de IL-6 ligeramente elevados, esta elevación no alcanza una significación positiva ($P=0.286$ para WT lactantes a los 7 días p.p. vs. WT controles vírgenes). Sin embargo, a los 14 p.p. el contenido de ARNm de IL-6 es similar entre hembras vírgenes y lactantes.

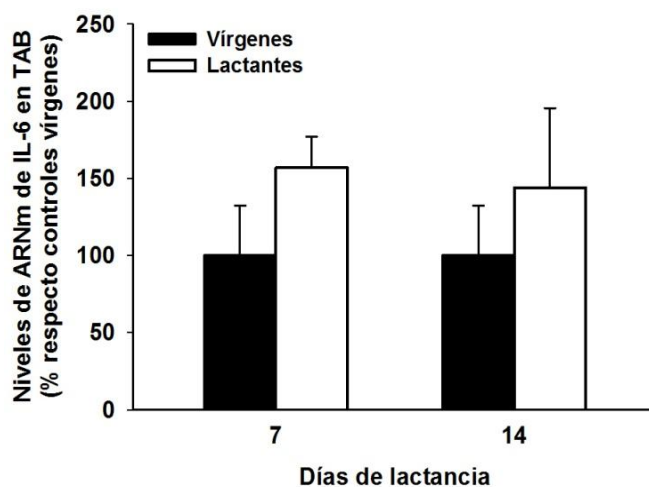


Figura 67. Niveles de ARNm de IL-6 en el TAB durante la lactancia (7 y 14 días) en ratones WT; n= 8 animales/grupo.

7.2.2. Efecto de IL-6 sobre la expresión en el TAB de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico durante la lactancia

Tras el parto el organismo materno rederiva el metabolismo de los nutrientes hacia el suministro de sustratos para la síntesis de leche en la glándula mamaria. Aunque tal y como se describía en la introducción apartado 5.2, la composición de la leche materna varía considerablemente entre especies, en general, los principales sustratos utilizados en este proceso son glucosa y ácidos grasos. Por ello, este estado reproductivo tiene un profundo impacto en el metabolismo lipídico en el TAB, aunque el papel de IL-6 en este estado no ha sido evaluado hasta la fecha.

7.2.2.1. Captación de ácidos grasos y movilización (lipólisis) de triglicéridos

Tras el parto se produce un marcado incremento de la captación de lípidos en la glándula mamaria, efecto que es mediado por un marcado incremento de la expresión y actividad de la enzima LPL en este tejido. Por el contrario, tanto la producción como la actividad de esta enzima disminuyen marcadamente en el tejido adiposo favoreciendo el flujo de metabolitos hacia la glándula mamaria (499,501,503). No obstante, en la rata durante la lactancia tanto los niveles ARNm como la actividad de LSH, en este tejido, retornan a los valores observados en animales vírgenes. Como consecuencia, al menos en la rata tras el parto la relación LSH/LPL se mantiene todavía elevada, aunque sus valores son inferiores a los observados en la gestación a término (476).

Curiosamente, y a diferencia de lo descrito para el periodo de lactancia en la rata, no hemos observado diferencia alguna en la expresión de ambas enzimas, y por tanto en su relación, entre ratones hembra vírgenes y lactantes a los 7 días post parto, en ninguno de los genotipos estudiados. Igualmente y tal como ocurría en el estudio realizado en la gestación, los niveles de ARNm de LPL y LSH eran similares en los grupos de animales control vírgenes WT e IL-6 KO. Sin embargo, y coincidiendo con la máxima movilización de los depósitos grasos abdominales en la madre lactante, el contenido de ARNm de LPL en el TAB abdominal en los ratones WT en periodo de lactancia se reducía marcadamente a los 14 días p.p., siendo esta reducción aproximadamente de un 70% respecto a los valores observados en animales vírgenes (Fig.68 A). Por el contrario la lactancia intermedia no provocó alteración alguna de la expresión génica de LSH (Fig. 68 B). Por tanto, en el ratón, la modulación de la expresión de ambas enzimas parece restringirse a la segunda semana post parto, a diferencia del caso de la rata, en la

que ésta se observa a lo largo de todo este periodo. En cuanto al efecto de la deficiencia de IL-6 sobre los niveles de ARNm de ambas enzimas en esta etapa del ciclo reproductivo, aunque no hemos detectado diferencias en los mismos entre ratones WT e IL-6 KO a los 7 días p.p., una vez alcanzada la etapa intermedia de la lactancia detectamos una marcada inhibición de la expresión de LSH en ratones IL-6 KO respecto a sus controles de genotipo salvaje (Fig. 68 B). Por tanto este patrón de expresión de LSH en la lactancia podría contribuir al mayor grado de adiposidad presente en los ratones IL-6 KO en esta etapa. Sin embargo, los niveles de ARNm de LPL son similares en hembras lactantes de ambos genotipos (Fig. 68 A). El análisis de la ratio LSH/LPL reveló, en consecuencia, que el incremento de la tasa de movilización respecto a la captación de lípidos en el TAB abdominal, durante la lactancia intermedia, es anulado por la deficiencia de IL-6 (Fig. 68 C)

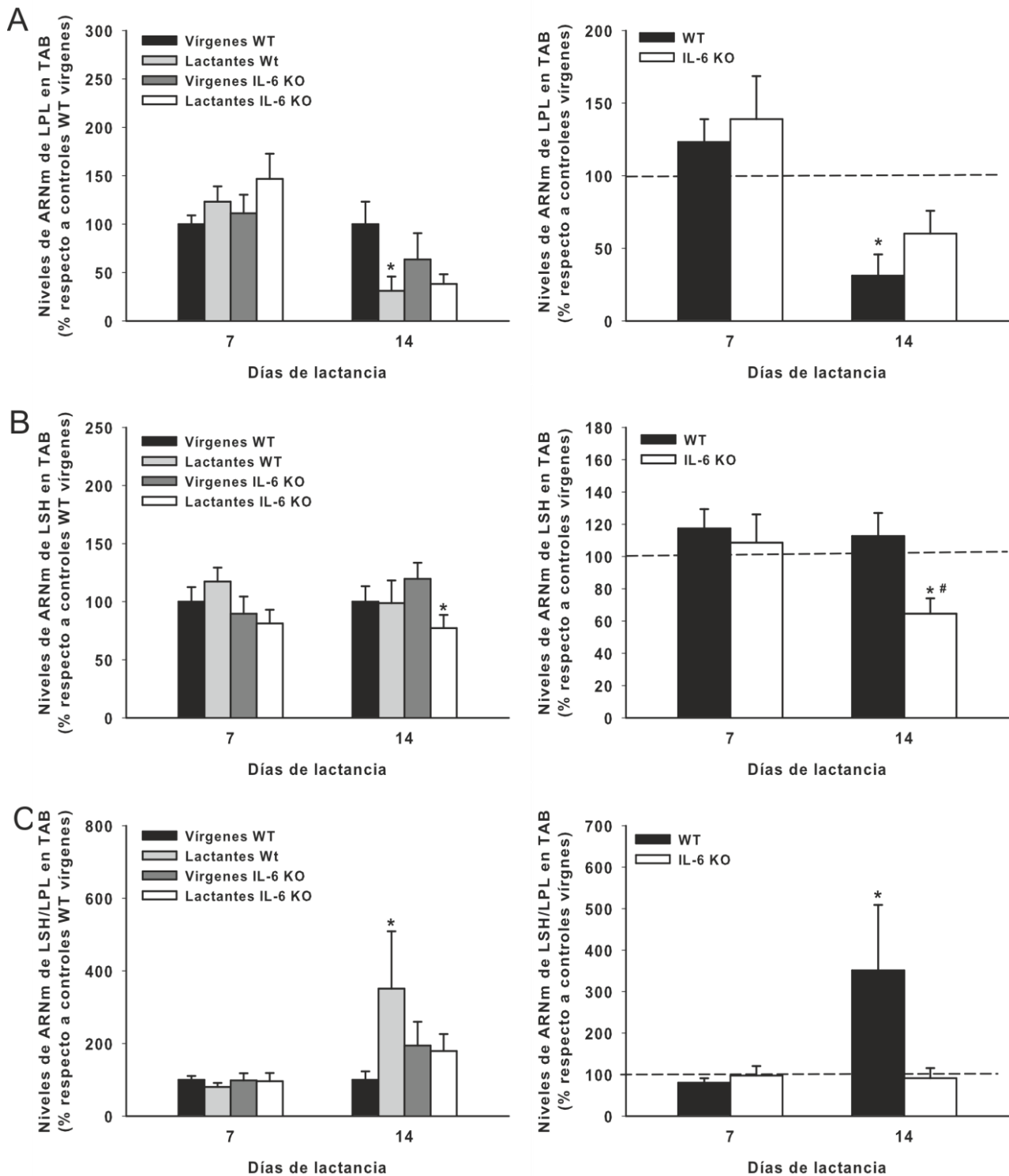


Figura 68. Niveles de ARNm de LPL y LSH en TAB en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Niveles de ARNm de LPL; B) Niveles de ARNm de LSH; C) Relación entre niveles de ARNm de LSH/LPL. Panel izquierdo: valores respecto a control WT virgen y panel derecho: valores respecto a control virgen correspondiente. Nivel de significación respecto a los ratones control virgen * $P < 0.05$, y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 6-8$ animales/grupo.

7.2.2.2. Síntesis de *novo* y oxidación de ácidos grasos

Debido a las crecientes demandas de lípidos para la síntesis láctea, la glándula mamaria se convierte en el principal órgano lipogénico del organismo en detrimento del tejido adiposo y el hígado (509). Por tanto, este estado reproductivo tiene un profundo impacto en el metabolismo lipídico a nivel del TAB abdominal, siendo este efecto mediado, entre otros factores, por una inhibición de la tasa de transcripción génica y actividad de las enzimas ACC-1 y FAS (383,603) evidente, al menos en la rata, desde el primer día post parto. Sin embargo en el ratón, según nuestros resultados, este efecto no se produce en la primera semana de la lactancia. Aunque, la deficiencia de IL-6 provoca un significativo incremento de la expresión de ACC-1 respecto a sus controles WT en la misma etapa del ciclo reproductivo (Fig. 69 A) que, junto con la reducción del contenido de ARNm de CPT-1 α en el TAB de ratones IL-6 KO lactantes respecto sus controles vírgenes del mismo genotipo (Fig. 69 C), podría contribuir a la posterior acumulación de grasa observada en este modelo en la lactancia intermedia. Ya en este punto temporal, y de acuerdo con lo previamente descrito en el caso de la rata, la expresión de las enzimas lipogénicas ACC-1 y FAS se encuentra marcadamente reducida en ratones WT pero no en los ratones IL-6 KO, sin verse afectada en ningún sentido la expresión de CPT-1 α (Fig. 69 C).

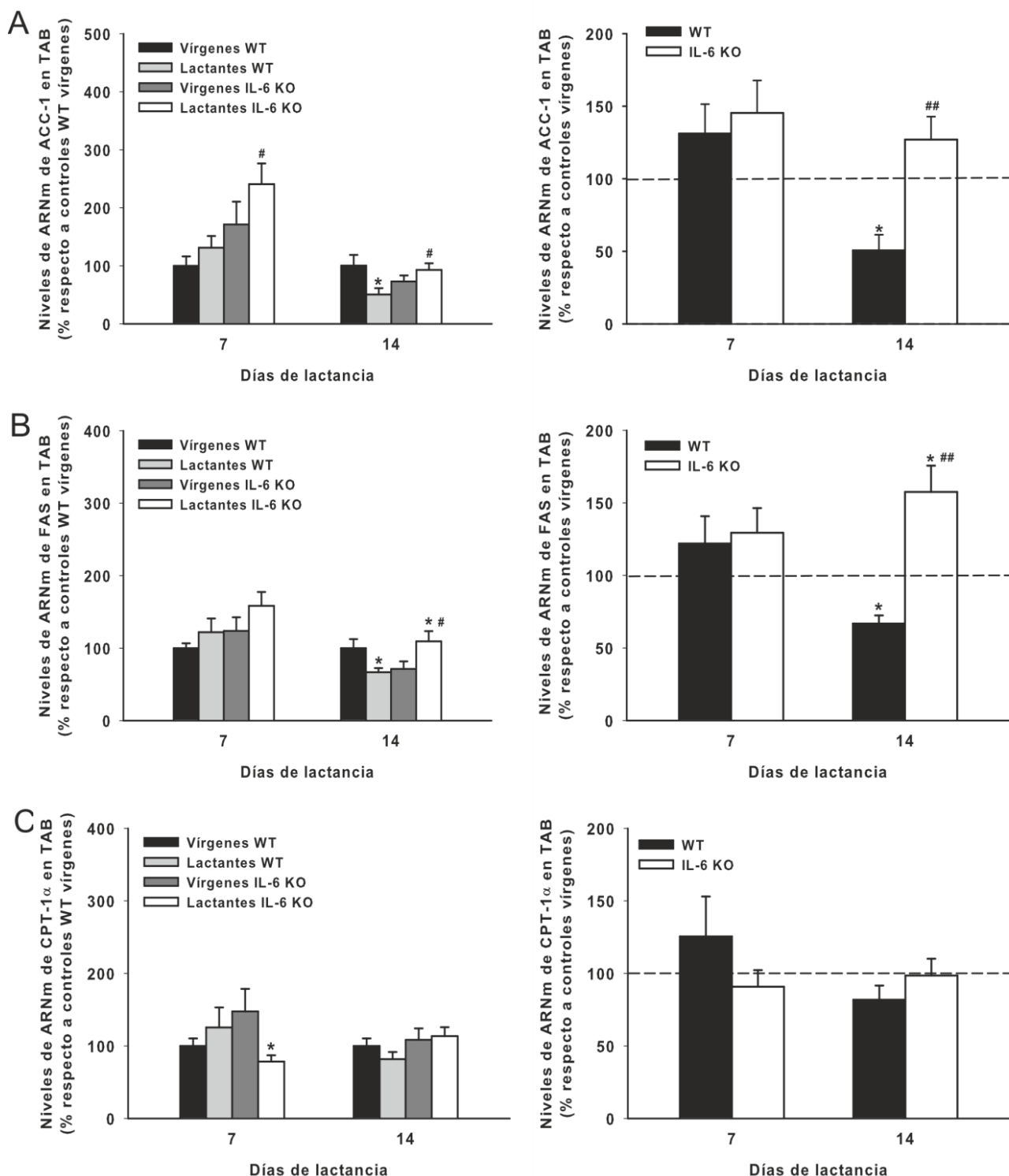


Figura 69. Niveles de ARNm de ACC, FAS y CPT-1 α en el TAB en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Niveles de ARNm de ACC, B) Niveles de ARNm de FAS, C) Niveles de ARNm de CPT-1 α . Panel izquierdo, valores respecto a controles WT, panel derecho, valores respecto a controles vírgenes. Nivel de significación respecto a controles vírgenes correspondientes * $P < 0.05$ y respecto a controles WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 6-7$ animales/grupo.

7.3. Metabolismo lipídico en el hígado durante la gestación

El hígado ejerce un papel importante en la regulación del metabolismo de las grasas actuando en cierta medida como un órgano gestor de los niveles circulantes de lípidos. Así, en situaciones de demanda energética, participa en la oxidación de ácidos grasos generando cuerpos cetónicos que serán empleados como fuente de energía en otros tejidos. Por el contrario, cuando las reservas energéticas se encuentran en exceso, y por tanto no hay demanda de sustratos metabólicos para el correcto funcionamiento de los distintos tejidos del organismo el hígado sintetiza colesterol y ácidos grasos, que posteriormente serán empaquetados en las VLDL y vertidas al torrente circulatorio. Sólo en situaciones en las que este sistema se encuentra saturado se produce una acumulación excesiva de lípidos en este tejido lo que degenera en un proceso lipotóxico conocido como esteatosis hepática o hígado graso.

7.3.1. Contenido lipídico en el hígado durante la gestación intermedia y a término

Teniendo en cuenta el bien conocido efecto estimulador de la gestación sobre la síntesis de lípidos a nivel hepático, que se traduce en un aumento del tamaño de este órgano (tabla 6) y en la característica hipertrigliceridemia materna decidimos comprobar si la deficiencia de IL-6 podría afectar al grado de acumulación de grasas neutras a este nivel durante la gestación intermedia y a término. Para ello se realizó un estudio histológico del hígado de animales WT e IL-6 KO vírgenes y gestantes a los 13 y 18 días p.c., mediante la técnica de tinción con Oil-Red. A continuación se evaluó el contenido promedio de grasas neutras por célula en imágenes representativas de cada sección utilizando el programa de análisis de imagen Image J 7.0[®] tal y como se describe en Material y métodos apartado 5. Tal y como se puede observar en las imágenes representativas de cada grupo experimental (panel superior de la Fig. 70) y en los valores obtenidos de su análisis mediante deconvolución, ya a los 13 días p.c. se observa un marcado incremento en el contenido de gotas lipídicas en las células hepáticas de los ratones WT e IL-6 KO. Sin embargo, en los últimos días de la gestación, y de acuerdo con los datos existentes en la bibliografía (605) el contenido de lípidos por hepatocito regresa a los valores basales en los ratones de genotipo salvaje mientras que, en los ratones IL-6 KO gestantes éste continúa significativamente incrementado (Fig.70 A y B). Estos datos sugieren una alteración en el proceso de

síntesis de novo y oxidación de ácidos grasos en este tejido que se agrava en ausencia de IL-6.

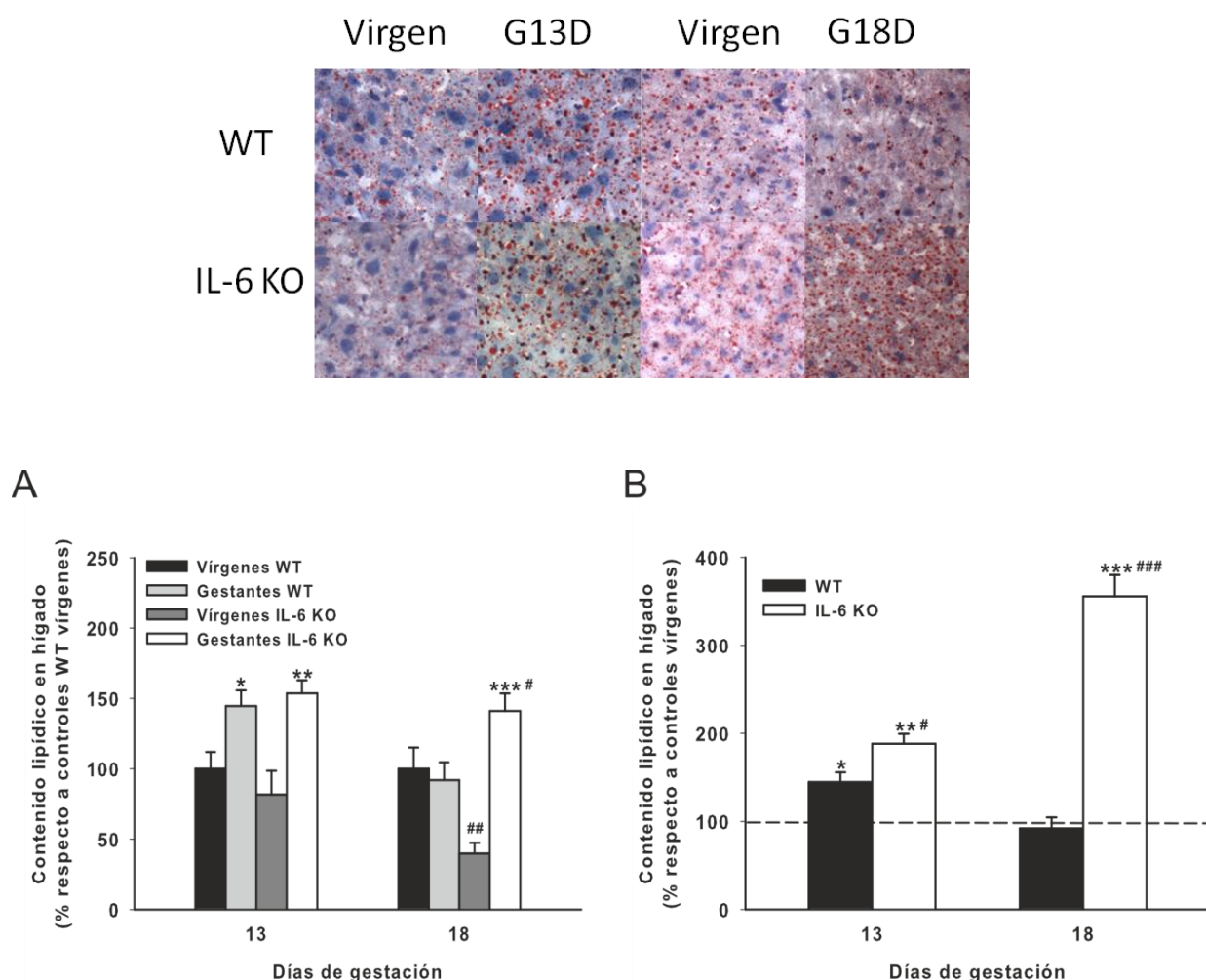


Figura 70. Contenido lipídico del hígado en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) en la gestación intermedia y a término (13 y 18 días p.c.). Panel superior, imágenes representativas 10X de secciones histológicas de hígado procedentes de animales de ambos genotipos, teñidas con Oil-Red. Contenido lipídico promedio por célula: A) Valores respecto a los controles WT vírgenes, B) Valores respecto a vírgenes correspondientes. Nivel de significación respecto a controles vírgenes * $P < 0.05$, $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; $n = 5-6$ animales/grupo.

7.3.2. Expresión de IL-6 y de IL-6R α en hígado durante la gestación

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en el contenido de lípidos en el tejido hepático entre animales de ambos genotipos durante la gestación y dado el recientemente descrito efecto de IL-6 sobre el proceso de oxidación mitocondrial de ácidos grasos a nivel hepático (195), decidimos analizar el perfil de expresión de IL-6 y su receptor en este tejido. Tal y como se puede observar en la Fig.71, en la gestación intermedia y coincidiendo con un aumento de la deposición de lípidos en este tejido, se produce una marcada elevación de los niveles de ARNm de esta citoquina y de su receptor, que tiende a mantenerse en el caso de IL-6R α hasta los 18 días p.c. aunque este efecto no alcanza significación positiva ($P=0.06$ para WT gestantes de 18 días p.c. vs. WT vírgenes).

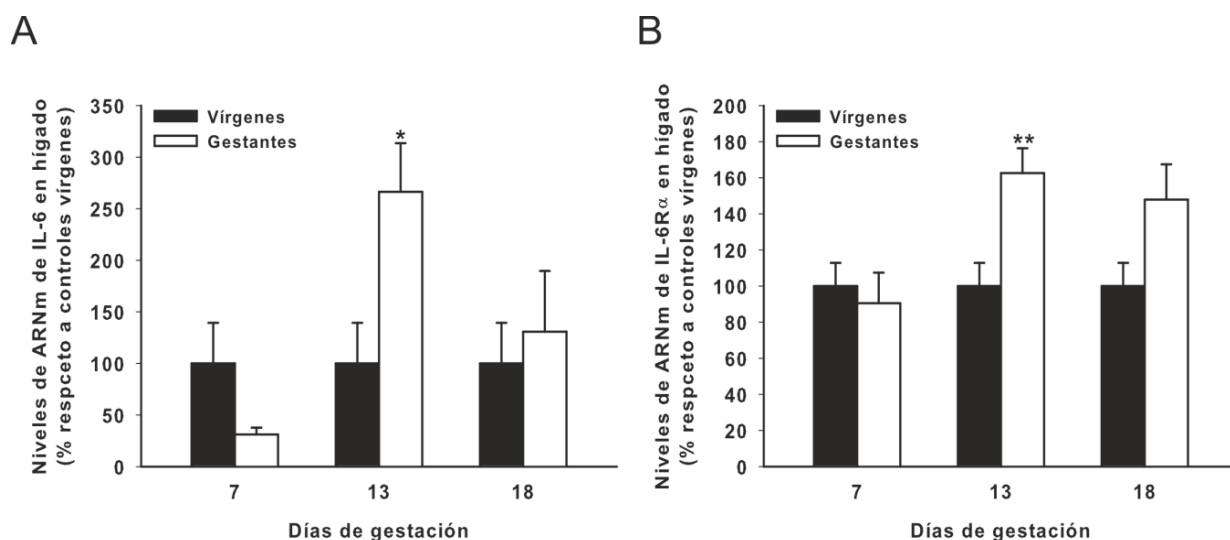


Figura 71. Niveles de ARNm de A) IL-6 y B) del receptor IL-6R α en hígado en ratones WT durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). Nivel de significación respecto a controles vírgenes * $P<0.05$ y ** $P<0.01$; $n=7-8$ animales/grupo

7.3.3. Metabolismo lipídico en hígado durante la gestación

En base a los resultados obtenidos decidimos analizar si el mayor incremento del contenido lipídico en el hígado de la madre gestante causado por la deficiencia de IL-6, podría estar asociada a un defecto en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria o en el proceso de síntesis de novo de los mismos. Curiosamente, a los 13 días p.c. los niveles de ARNm de CPT-1 α en el hígado de los animales de genotipo salvaje se incrementaban en aproximadamente un 60 % respecto a los valores presentes en ratones no gestantes, efecto que es anulado por la deficiencia en IL-6 (Fig. 72 C). Por tanto un incremento en la oxidación de ácidos grasos a partir de este día podría justificar la normalización del contenido hepático de lípidos en la última etapa de la gestación. Sin embargo, la deficiencia de IL-6 bloquea este efecto favoreciendo de esta manera la mayor deposición lipídica observada en la gestación a término. Además, a los 18 días p.c. se observa una marcada inhibición de la síntesis de novo de ácidos grasos, medida en función de los niveles de ARNm de ACC-1 y FAS, que se produce de forma similar en ambos genotipos lo que contribuiría en mayor medida a la normalización del contenido de lípidos. Por último, este efecto inhibitorio de la gestación a término se extiende a la expresión hepática de CPT-1 α , que disminuye en un 30% respecto a los observados en ratones controles vírgenes. Este efecto es anulado de nuevo por la ausencia de IL-6 (Fig.72). A este respecto se ha demostrado que esta inhibición de la oxidación mitocondrial de lípidos durante la gestación a término en el ratón, podría ser compensada por el incremento de la síntesis y secreción de VLDL por el hígado (605).

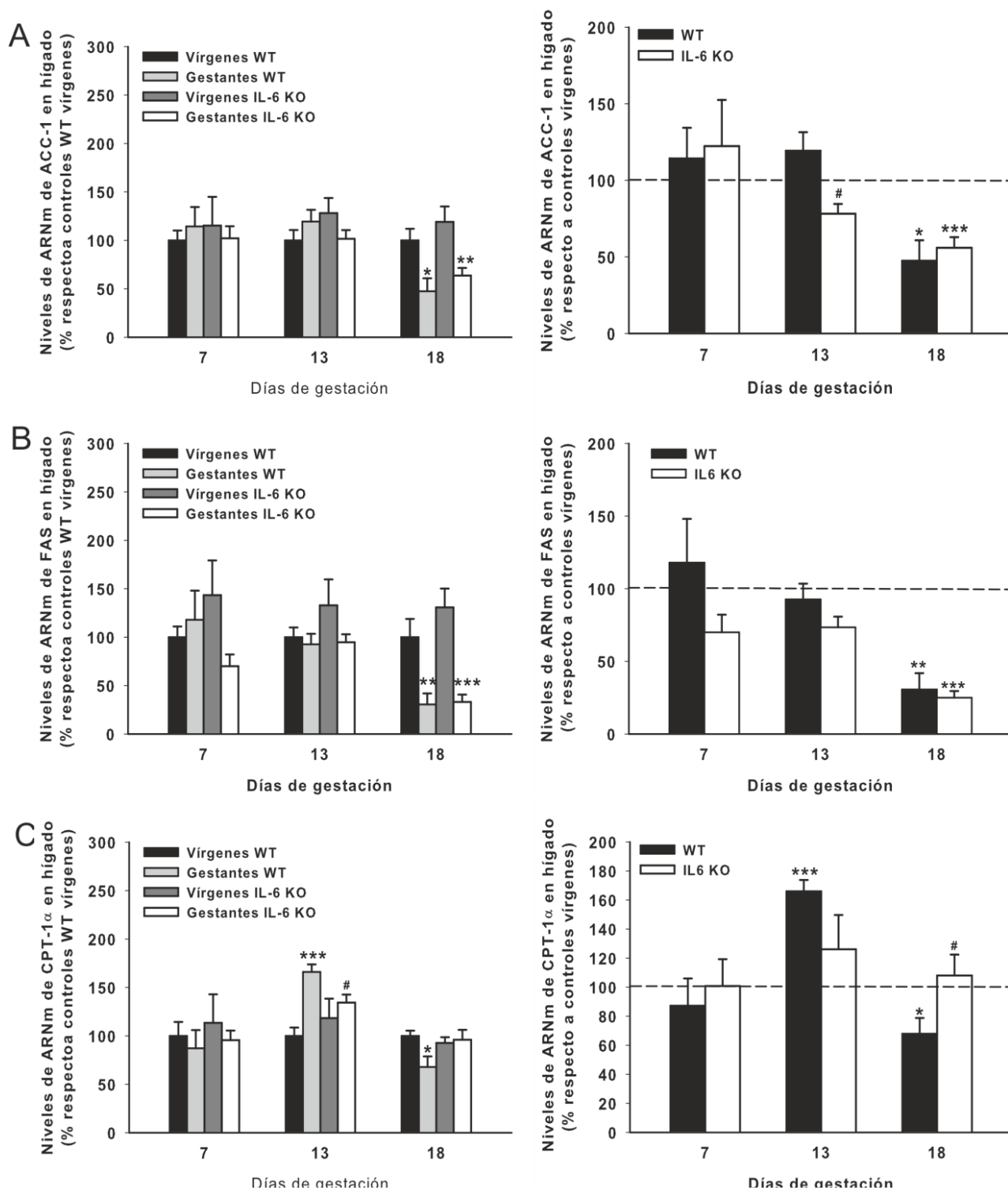


Figura 72. Niveles de ARNm de ACC, FAS y CPT-1 α en el TAB en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la gestación (7, 13 y 18 días p.c.). A) Niveles de ARNm de ACC, B) Niveles de ARNm de FAS, C) Niveles de ARNm de CPT-1 α . Panel izquierdo, valores respecto a controles WT, panel derecho, valores respecto a controles vírgenes. Nivel de significación respecto a controles vírgenes correspondientes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y respecto a controles WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$; $n = 7-8$ animales/grupo.

7.4. Metabolismo lipídico en el hígado durante la lactancia

Durante la lactancia, al igual que durante la gestación, el metabolismo hepático de los ácidos grasos es redirigido principalmente hacia la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos. Estas especies lipídicas, empaquetadas en las lipoproteínas de muy baja densidad, son vertidas al torrente circulatorio y transportadas a la glándula mamaria donde son utilizadas como sustratos metabólicos para la lactogénesis (606), mientras que durante la gestación el órgano receptor es el tejido adiposo. Sin embargo, a lo largo del ciclo reproductivo en la rata y dependiendo del estado nutricional materno, a nivel hepático, se produce una alteración de la tasa relativa de utilización de ácidos grasos para la síntesis de especies esterificadas o para su oxidación. Este efecto es mediado por un conjunto de mecanismos reguladores entre los que se encuentran: 1) alteraciones en la transcripción génica y actividad de enzimas implicadas en la síntesis de novo de ácidos grasos, 2) alteraciones en la actividad de enzimas que catalizan las primeras reacciones de la vía de esterificación del glicerol-3-fosfato y de la síntesis de acilcarnitina y 3) una reducción de la capacidad oxidativa mitocondrial. En situaciones de restricción calórica una gran parte de los ácidos grasos circulantes son derivados al hígado donde son oxidados a cuerpos cetónicos, efecto que resulta en el desarrollo de una condición denominada cetonemia. Así, y como prueba de las diferencias en los mecanismos adaptativos que tienen lugar a lo largo de la gestación y lactancia, mientras las ratas gestantes muestran una marcada susceptibilidad al desarrollo de cetonemia durante la lactancia intermedia las ratas lactantes muestran una mayor resistencia al desarrollo de esta condición que los animales vírgenes.

7.4.1. Contenido lipídico en el hígado durante la lactancia temprana e intermedia

Como era de esperar, el análisis del contenido hepático de triglicéridos mediante tinción con Oil-Red reveló que la lactancia induce la presencia de una mayor concentración de grasas neutras en el hígado materno, evidente ya desde la primera semana después del parto (Fig. 73). Aunque de nuevo no existían diferencias evidentes entre animales vírgenes de ambos genotipos, los ratones deficientes en IL-6 mostraban un marcado incremento del depósito lipídico a nivel hepático durante la lactancia intermedia, mostrando unos niveles significativamente superiores a los observados en los ratones de genotipo salvaje en el mismo estado reproductivo (Fig. 73 A). Estos datos sugieren que

IL-6 podría participar en las adaptaciones del metabolismo lipídico en el hígado materno durante el periodo de lactancia.

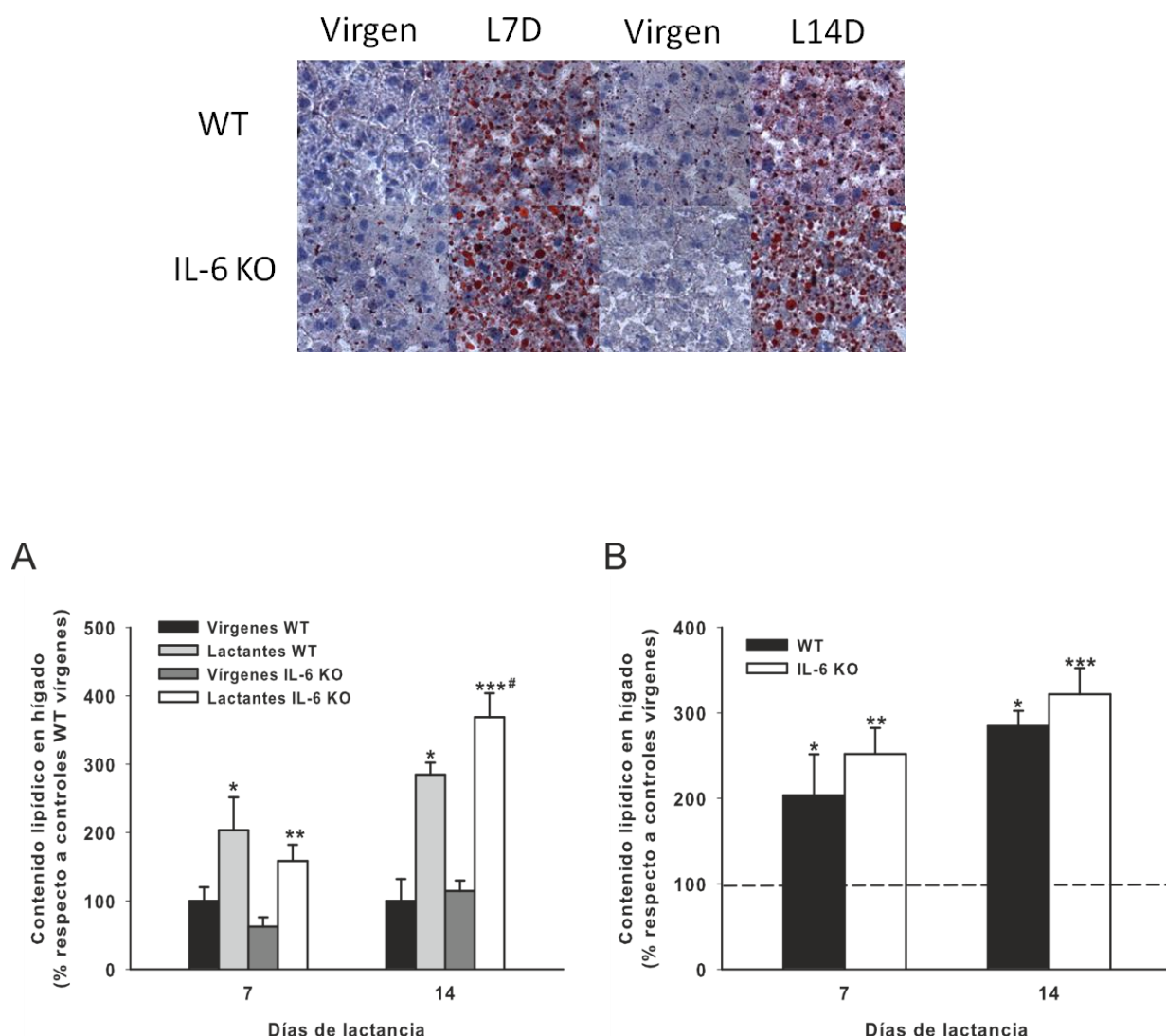


Figura 73. Contenido lipídico del hígado en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) en la lactancia inicial e intermedia (7 y 14 días p.p.). Panel superior, imágenes representativas 10X de secciones histológicas de hígado procedentes de animales de ambos genotipos, teñidas con oil-red. Contenido lipídico promedio por célula: A) Valores respecto a los controles WT vírgenes, B) Valores respecto a vírgenes correspondientes. Nivel de significación respecto a controles vírgenes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y respecto a animales WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$; $n = 5-6$ animales/grupo.

7.4.2. Expresión de IL-6 y de IL-6R α en hígado durante la lactancia

De ser válida la anteriormente citada hipótesis, la producción hepática de IL-6 o la concentración de su receptor en el hepatocito deberían modificarse durante la lactancia. A este respecto nuestros resultados indican que, los niveles hepáticos de ARNm de IL-6 se incrementan marcadamente en la lactancia intermedia, coincidiendo con la etapa de mayor inhibición de la actividad oxidativa mitocondrial, y llegando a triplicar los valores observados en animales vírgenes (Fig.74 A). En cuanto a la expresión del receptor de esta citoquina en el hígado materno, ésta comienza a incrementarse a los 7 días p.p., aunque esta elevación no alcanza significación positiva ($P=0.06$ para ratones WT lactantes a los 7 días p.p. vs. controles vírgenes) hasta la segunda semana de lactancia (Fig. 74 B).

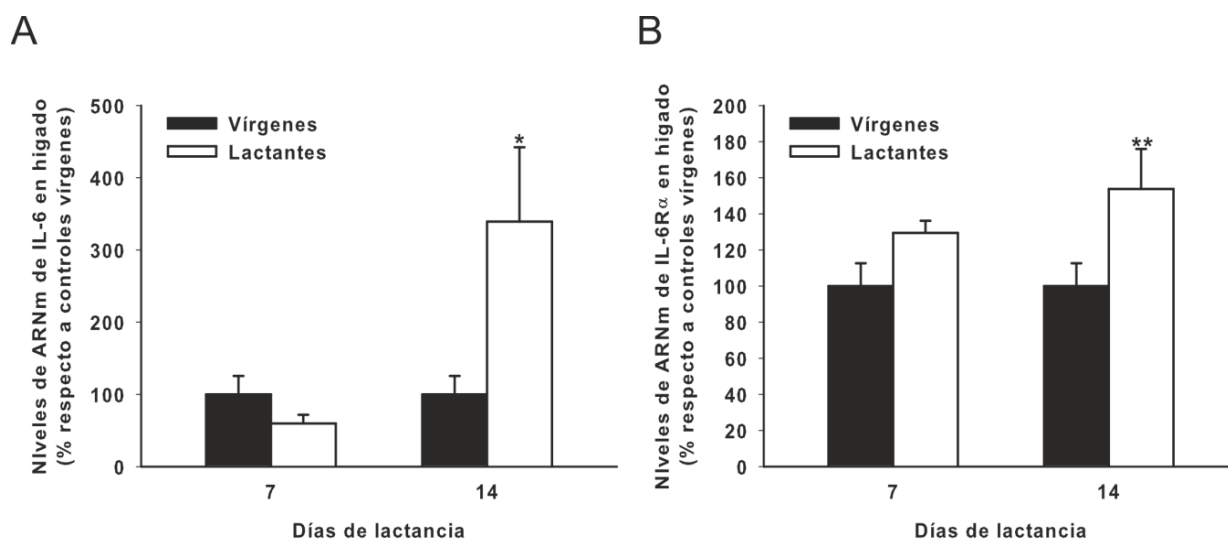


Figura 74. Niveles de ARNm de A) IL-6 y B) del receptor IL-6R α en hígado en ratones WT durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). Nivel de significación respecto a controles vírgenes * $P<0.05$ y ** $P<0.01$; $n=7-8$ animales/grupo

7.4.3. Efecto de IL-6 sobre enzimas implicadas en el metabolismo lipídico en hígado durante la lactancia: síntesis de *novo* y oxidación de ácidos grasos

De acuerdo con lo descrito en el apartado 5.2. de la introducción, tras el parto en la rata se produce una activación de la maquinaria lipogénica en el tejido hepático, como demuestra el marcado incremento de la expresión y la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de *novo* de ácidos grasos ACC-1 y FAS (383,603). Como se puede observar en la Fig. 75 A y B, durante la lactancia temprana en el ratón los niveles de expresión de ambas enzimas en este tejido se elevan drásticamente, llegando a triplicar e incluso cuádruplicar los valores observados en animales vírgenes. Dos semanas tras el parto este incremento en el contenido hepático de ARNm de ACC y FAS se mantiene todavía aunque este efecto estimulador es de menor magnitud. Sin embargo, no hemos detectado efecto alguno de la ausencia de IL-6 sobre la expresión de ambas enzimas en animales vírgenes o en periodo de lactancia.

Por último, y de acuerdo con un reconocido papel estimulador de IL-6 sobre la oxidación de ácidos grasos, los niveles de ARNm de CPT-1 α en el hígado de la madre lactante se encuentran marcadamente reducidos en ausencia de IL-6 tanto a los 7 como a los 14 días p.p. (Fig. 75 C). Este efecto, sin embargo no se observa en ratones WT en ninguno de los puntos temporales estudiados a lo largo de la lactancia, lo que sugiere la existencia de diferencias entre especies en la regulación transcripcional de esta proteína en este periodo reproductivo (569). Aunque la función fisiológica del elevado depósito lipídico a nivel hepático durante la lactancia no está del todo esclarecida, nuestros datos sugieren que una elevación de la producción de IL-6 y su receptor en el hígado de la madre lactante podría actuar como un mecanismo protector que frenase la excesiva acumulación de especies lipídicas en este tejido. De hecho, en apoyo de esta hipótesis los ratones deficientes en IL-6 presentan un mayor acúmulo de grasa a nivel hepático durante la lactancia intermedia.

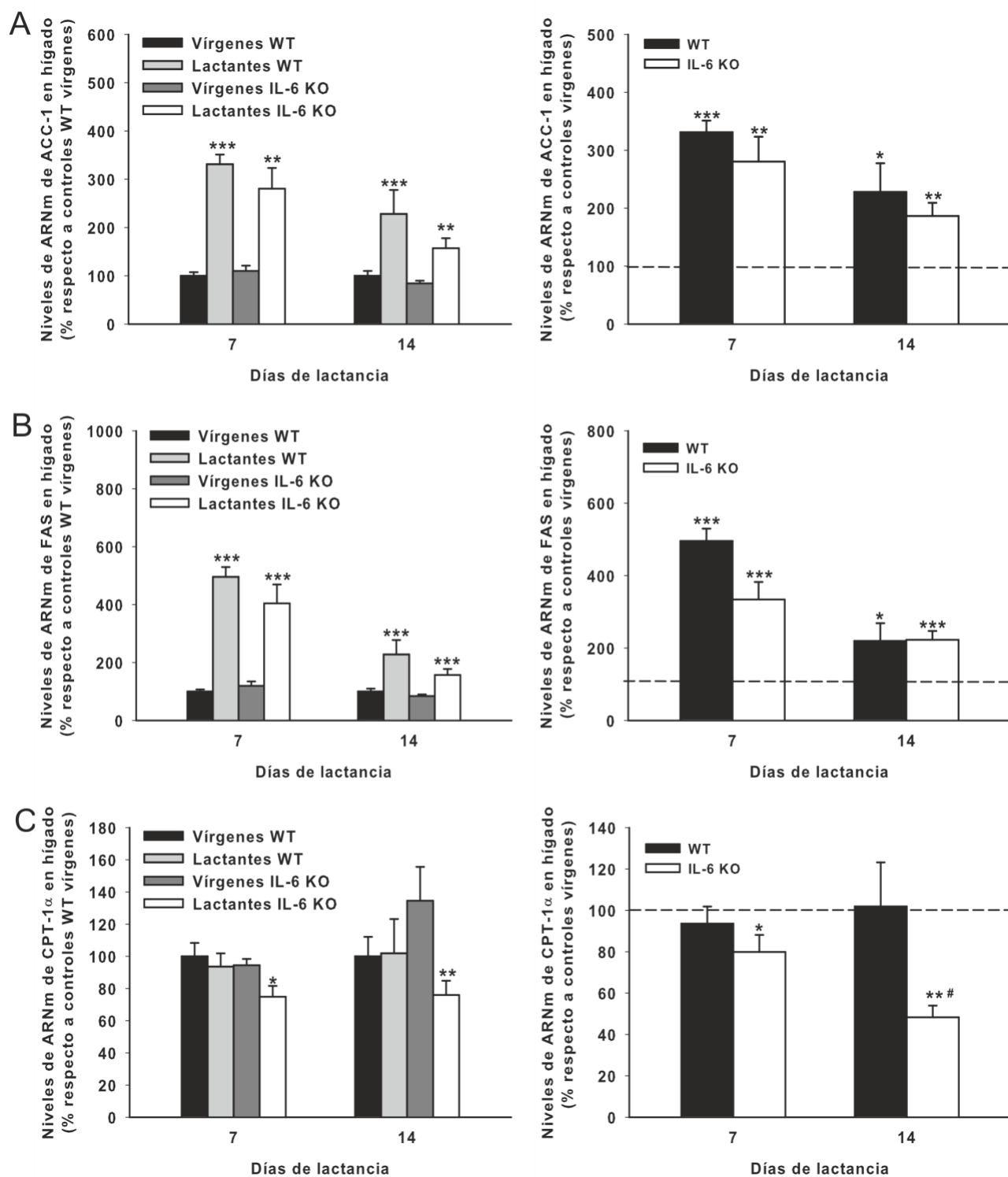


Figura 75. Niveles de ARNm de ACC, FAS y CPT-1 α en hígado en ratones WT y deficientes en IL-6 (IL-6 KO) durante la lactancia (7 y 14 días p.p.). A) Niveles de ARNm de ACC, B) Niveles de ARNm de FAS, C) Niveles de ARNm de CPT-1 α . Panel izquierdo, valores respecto a controles WT, panel derecho, valores respecto a controles vírgenes. Nivel de significación respecto a controles vírgenes correspondientes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y respecto a controles WT en el mismo estado reproductivo # $P < 0.05$; $n = 7-8$ animales/grupo.

DISCUSIÓN

Más allá de su papel tradicional como depósito de energía, el TAB es actualmente considerado como un activo órgano endocrino que produce y secreta una serie de factores, denominados genéricamente adipocitoquinas que, de una manera autocrina, paracrina y/o endocrina, participan en la regulación del metabolismo energético (78,80,607). Entre estas adipocitoquinas la IL-6, citoquina pleiotrópica que regula la respuesta inmune innata, y juega un papel crucial en el desarrollo de la respuesta inflamatoria de fase aguda (608) ha sido objeto de especial atención a lo largo de la última década por su acción reguladora del metabolismo lipídico (154,158,177,178,182,609) y de la señalización de la insulina (58,111,189,195,610-613). La comprensión de la forma en que IL-6 modula a nivel central y periférico la homeostasis de los nutrientes resulta complicado debido a sus efectos multi-sistémicos que resultan, a menudo, contradictorios en diversos estados fisiológicos (610,614-616). De esta manera, la secreción en cantidades crecientes de esta citoquina por el tejido adiposo en expansión, resulta en una elevación de sus niveles circulantes que contribuye al estado pro-inflamatorio que conduce al desarrollo de resistencia a la insulina en la obesidad (617,618). Por el contrario, la IL-6 producida por el músculo esquelético se ha asociado a los efectos beneficiosos del ejercicio físico sobre la sensibilidad a la insulina (619).

Además de sus efectos periféricos, múltiples evidencias experimentales indican que IL-6 podría participar a nivel central en la regulación de la ingesta, el metabolismo y el gasto energético, modulando en último término el contenido de grasa corporal (157,158,169,252,611). En esta línea, hoy en día parece existir un consenso general acerca del papel crucial de la IL-6 producida centralmente (astrocitos y neuronas) en las acciones catabólicas de esta citoquina a nivel del SNC (251,611,619,620). Sin embargo, es importante resaltar que existen tres vías conocidas a través de las cuales las citoquinas periféricas pueden ejercer sus efectos a nivel del SNC, que incluyen: a) su acción directa a nivel del parénquima cerebral tras cruzar la barrera hematoencefálica o tras su acceso al mismo a través de regiones circunventriculares (621), b) su acción sobre las células del endotelio vascular del territorio cerebral activando sistemas de segundos mensajeros como el óxido nítrico y los prostanoïdes; y c) por último la presencia a nivel periférico de citoquinas y otros mediadores inflamatorios, incluso en bajos niveles, puede ser detectada por fibras aferentes sensoriales del SNA, como las

pertenecientes al nervio vago, que a su vez a través de sus proyecciones ascendentes informan al SNC de la presencia de inflamación en la periferia (622,623).

Por otro lado, es importante señalar que la mayoría de los estudios que abordan el papel de IL-6 en la regulación de la homeostasis energética se centran en la evaluación de situaciones patológicas como la obesidad, alteraciones cardiovasculares o respuesta a estímulos inflamatorios o infecciosos (127,624). Salvo los estudios relacionados con el impacto de la producción central y periférica de IL-6 durante el ejercicio físico en la regulación del peso corporal y el metabolismo energético, son pocos los trabajos que abordan el papel de esta citoquina en este contexto en situaciones fisiológicas en las que un marcado incremento de las demandas energéticas compromete el mantenimiento de un correcto balance energético. Crecimiento somático y reproducción constituyen ejemplos claros de este tipo de situaciones (4). Por todo ello, este trabajo se ha centrado en el estudio de la posible contribución de IL-6 en las adaptaciones que tienen lugar en los mecanismos centrales y periféricos que regulan la ingesta, la utilización de los sustratos energéticos por los tejidos del organismo y la termogénesis durante la gestación y lactancia. En ambos estados fisiológicos se producen importantes alteraciones neuroendocrinas que contribuyen a mantener la homeostasis materna mientras que se asegura el crecimiento fetal (*homeorresis*), cuyos efectos sobre los distintos componentes de la ecuación del balance energético han sido claramente delimitados tanto anatómica como temporalmente en distintas especies de animales de experimentación (roedores, rumiantes...). Por todo ello, el abordaje experimental del presente estudio, mediante la utilización de ratones modificados genéticamente en los que se ha eliminado la producción endógena de IL-6, no sólo ayuda a identificar el posible papel de esta citoquina en estas funciones en este tipo de estados fisiológicos, sino que también permite establecer paralelismos con situaciones patológicas en las que el sistema de control homeostático se encuentra alterado. De hecho, este modelo animal desarrolla obesidad en la madurez (6 meses de edad) (157,158,174,195,588) asociada a distintas alteraciones en las rutas del metabolismo lipídico a nivel del tejido adiposo y hepático.

El sistema IL-6/IL6R α durante la preñez y la lactancia

En este trabajo hemos decidido utilizar ratones de 12 semanas de edad con el fin de situarnos en el momento de máxima capacidad reproductiva de esta especie, en ausencia

de un incremento en el contenido de grasa corporal (205), que pudiese enmascarar el efecto de la delección de la citoquina en cuestión sobre los parámetros estudiados. Así, a pesar de partir de un menor peso y contenido de grasa corporal que sus controles de genotipo salvaje, los ratones IL-6 KO muestran un incremento de peso similar a éstos durante la gestación, que se eleva significativamente durante la lactancia. Aunque en principio estos resultados podrían sugerir que IL-6 no tendría efecto alguno sobre el balance energético durante la gestación, la ganancia de peso corporal refleja no sólo los cambios en el contenido de grasa materno y el tamaño de los depósitos de otros nutrientes, sino también el crecimiento fetal y de diversas estructuras maternas como la placenta, el hígado y el útero además del incremento de fluido extracelular y volumen sanguíneo (424,426). Curiosamente el análisis de composición corporal en este periodo reproductivo indica que la ausencia de esta citoquina induce una mayor acumulación (confirmada por estudios transversales y longitudinales) y una menor movilización de grasa abdominal durante las fases anabólica y catabólica de la gestación, respectivamente. Estos resultados concuerdan con el conocido efecto reductor sobre el tamaño de los depósitos grasos abdominales (mesentérico y retroperitoneal), de la administración central y periférica de IL-6, aguda o crónica, en dosis que no producen una respuesta inflamatoria (158). Además la gestación, durante su primera etapa, anula el efecto de la deficiencia de IL-6 sobre el contenido de grasa subcutánea, alcanzando el peso de este depósito en ratones IL-6 KO su valor máximo ya a los 13 días p.c. A este respecto, la mayor parte de los datos existentes en la bibliografía acerca del efecto de IL-6 sobre los distintos depósitos de grasa corporales hacen referencia a la grasa visceral. Esto es debido a que tanto en humanos como en roedores esta parte del “órgano” adiposo es una mayor fuente de citoquinas pro-inflamatorias (625) y dada su localización próxima a la vena porta está en disposición de influenciar el aporte de triglicéridos al tejido hepático (626). Sin embargo, únicamente hemos podido encontrar una referencia acerca del papel de IL-6 como mediador de los efectos anti-inflamatorios del ejercicio físico moderado e intenso sobre el depósito graso subcutáneo (627).

La lactancia, estado que implica una mayor movilización aún si cabe de los depósitos grasos abdominales, anula la diferencia de peso existente entre ratones IL-6 KO y sus controles WT. Nuestros datos demuestran claramente que este efecto es debido de nuevo a un bloqueo del consumo de las reservas grasas abdominales y a un mayor depósito de grasa subcutánea, lo que confirma nuestra hipótesis de un posible papel de

IL-6 como factor modulador de las reservas grasas maternas tanto durante la gestación como durante la lactancia. Con respecto al curioso efecto de la deficiencia de IL-6 sobre la masa del tejido adiposo subcutáneo es importante resaltar que, en ratones hembra las distintas divisiones de este depósito -anterior y posterior (dividido a su vez en dorsolumbal, inguinal y gluteal)- pertenecen a los cinco pares de glándulas mamarias (628). Durante la gestación y la lactancia la mayor parte de los adipocitos de estos depósitos desaparecen como consecuencia del desarrollo de la glándula mamaria. De esta manera, desde la gestación intermedia y durante la lactancia, los adipocitos de este depósito sufren un proceso de transdiferenciación reversible por el cual, gran parte de ellos se transforman en células epiteliales productoras y secretoras de leche que se fusionan con los alveolos glandulares (311,629). El resto de los adipocitos sufre un proceso de delipidación, perdiendo gran parte de su contenido de triglicéridos, que se revierte tras el destete. Teniendo en cuenta que la porción de tejido graso subcutáneo diseccionada en este estudio correspondía a las glándulas mamarias inguinales y parte de las abdominales, es lógico suponer, a pesar de no haber realizado los pertinentes análisis histológicos, que nuestras muestras incluirían mayoritariamente células epiteliales. A este respecto, el grupo de Jansson ha descrito recientemente que los ratones IL-6 KO lactantes presentan un mayor contenido de leptina en la leche materna (630). En la glándula mamaria humana la producción de leptina depende de las células epiteliales, no observándose paradójicamente correlación entre la secreción de esta hormona y el tamaño de la glándula (631). Entre otras funciones la leptina sintetizada a este nivel se ha implicado en el proceso de desarrollo glandular (632) así como el crecimiento neonatal afectando los mecanismos centrales reguladores de la ingesta y el gasto energético de forma permanente (630,633). Por tanto, el posible papel de IL-6 en la fisiología de la glándula mamaria merece una mayor atención que se extiende más allá del objetivo de esta tesis.

Otras de las adaptaciones fisiológicas características de la gestación y la lactancia es el desarrollo de una marcada hiperfagia que permite el correcto funcionamiento metabólico de los tejidos maternos, en presencia de un incremento de las demandas de sustratos energéticos para sustentar el crecimiento fetal y la lactogénesis (418). Sin embargo en este estudio, hemos detectado únicamente un sutil efecto de la ausencia de IL-6 sobre el incremento de la ingesta durante la gestación temprana, viéndose sus valores relativos al peso corporal incrementados en ratones IL-6 KO. Estos datos

concuerdan con estudios previos que demostraron un claro efecto anorexigénico de la administración central de IL-6, cuando era administrada de forma aguda, reduciéndose, su efecto o desapareciendo por completo, cuando es administrada de forma crónica (158). De hecho, los ratones IL-6 KO presentan un incremento de la tasa de ingesta sólo cuando han desarrollado plenamente su fenotipo obeso (157) y únicamente la deficiencia conjunta de IL-6 e IL-1 en el ratón provoca un efecto claro sobre la ingesta, previo al incremento del peso corporal (171). Además, recientemente se ha publicado que el ejercicio físico, que induce un incremento de la producción central (hipotálamo) y periférica (músculo) de IL-6, provoca una disminución de la tasa de ingesta en presencia de un incremento de la producción hipotalámica de IL-10 (611). Estas evidencias experimentales demuestran que esta citoquina necesita de otras moléculas de señalización del sistema inmune para ejercer un efecto evidente sobre los mecanismos implicados en la regulación del consumo de alimentos.

En este contexto, la gestación es un excelente modelo fisiológico para el estudio de la integración hipotalámica de las distintas señales aferentes procedentes de órganos periféricos implicados en la regulación del balance energético del organismo (422,436,440,447). Entre la gran variedad de factores incluidos en este complejo sistema de señalización se encuentran entre otros: hormonas procedentes del ovario y la placenta y señales de naturaleza metabólica y endocrina que transmiten información sobre el estado energético del organismo tanto a corto como a largo plazo como por ejemplo, colecistoquinina o leptina e insulina, respectivamente. Estas señales aferentes periféricas modulan la función hipotalámica regulando en último término la ingesta, la homeostasis energética y la reproducción. La información aferente clave que conduce a la adaptación neuroendocrina durante la gestación está codificada en el ovario y en la unidad feto-placentaria (447). Sin embargo, a medida que avanza este estado, el tejido adiposo materno produce y secreta crecientes cantidades de adipoquinas, que podrían participar en el control coordinado del metabolismo de los nutrientes en los diferentes tejidos implicados en el establecimiento y mantenimiento de las reservas energéticas del organismo, incluyendo los depósitos grasos (418).

Los resultados descritos en esta tesis indican que la adipocitoquina IL-6, producida por el tejido adiposo, el hipotálamo y quizás por otros tejidos maternos como la placenta (592) contribuye a las adaptaciones que se producen en el cerebro materno en los circuitos neuronales involucrados en la regulación de la ingesta y del gasto energético.

Sin embargo, como se ha mencionado con anterioridad IL-6 puede ser producida a nivel central tanto por neuronas como por células de la glía, aunque en este trabajo no hemos observado cambios, durante la gestación, en la producción hipotalámica de esta citoquina, analizada en función de su grado de expresión transcripcional. Por el contrario, los niveles hipotalámicos del ARNm de su receptor, IL-6R α , se encuentran reducidos en ratones gestantes tanto en la etapa inicial (7 días p.c.) como en la fase final de la gestación (18 días p.c.). Como es bien conocido, la administración central de IL-6 reduce el grado de adiposidad corporal como consecuencia de una estimulación del gasto energético y en menor medida una inhibición de la ingesta (157,158,170). Por tanto, la disminución de la expresión de IL-6R α durante la fase inicial de la gestación podría inhibir la acción catabólica de la IL-6 endógena y, contribuir de este modo al incremento de la ingesta y del depósito de grasa abdominal observado en el ratón durante esta etapa de la gestación. De hecho, a los 7 días p.c., la ausencia de señalización de IL-6 en el ratón, causada por la delección del ligando (IL-6 KO), incrementó aún más ambos parámetros en comparación con los correspondientes controles vírgenes del mismo genotipo.

La expresión génica de IL-6 e IL-6R α es activada conjuntamente en ciertas áreas del cerebro como el hipotálamo en respuesta a estímulos inmunológicos, como la administración de LPS o el daño tisular (621), pero también como parte del efecto anti-inflamatorio del ejercicio físico (611). En contraste con los resultados obtenidos en la rata, donde la producción de IL-6 por el tejido adiposo, su contenido en el LCR, así como sus niveles circulantes se muestran aumentados ya en el día 8 de gestación (435); nuestros resultados y los de otros autores muestran que en el ratón, los niveles de ARNm de IL-6 a nivel del hipotálamo y del tejido adiposo, además de su concentración plasmática permanecen estables durante la fase temprana de la gestación (83). Estos resultados sugieren que en lugar de una disminución de la producción de IL-6 a nivel central o periférico, otros factores podrían ser los responsables de la inhibición de la expresión del receptor de esta citoquina. Además, de acuerdo con esta hipótesis, el contenido hipotalámico de ARNm de IL-6R α es inhibido de modo similar por la deficiencia de IL-6 y por la gestación a término, etapa en la que la hiperfagia materna (423,424,464), el contenido de ARNm de IL-6 en el tejido adiposo y los niveles circulantes de esta citoquina alcanzan su máximo (83).

Un posible factor implicado en la modulación de la sensibilidad hipotalámica a IL-6 es la progesterona, cuya producción ovárica aumenta desde el día 5 al 9 p.c., regresa a los niveles basales durante la gestación intermedia (al mismo tiempo que se produce el cese de la pulsatilidad de prolactina), para luego verse incrementada de nuevo en los días previos al parto (634). Tanto la progesterona como el estradiol, cuyos niveles séricos también se incrementan durante la última etapa de la gestación (634), inhiben la expresión de IL-6R α y alteran las vías de transducción de señales de IL-6 in vivo (635) e in vitro (636). Además, puesto que no medimos los niveles de IL-6 en el líquido cefalorraquídeo ni en suero, no podemos excluir la posibilidad de que en el ratón, como se ha sugerido para la rata gestante (435), una menor entrada de IL-6 en el SNC ante una producción hipotalámica invariable de esta citoquina, podría contribuir a la aparente “resistencia central” a IL-6 al final de la preñez, contribuyendo de esta manera al pleno desarrollo de hiperfagia materna. De hecho, está bien establecido que durante la gestación, la inhibición de la señalización de leptina ejerce una acción permisiva similar sobre la ingesta (422,440,440,637). Por el contrario, en la rata al comienzo de la fase catabólica de la gestación (día 13 p.c.), este mecanismo de protección no parece estar habilitado como refleja el incremento en paralelo de los niveles centrales de IL-6, medidos por el contenido del LCR, la producción de esta citoquina y sus niveles circulantes (435). Sin embargo, en esta etapa gestacional en el ratón, la placenta está plenamente desarrollada (428) y los niveles de progesterona retornan a los valores basales (634) por lo que, el aumento de la producción periférica de IL-6 (638) procedente de diversas fuentes como el tejido adiposo, como demostramos en este trabajo, y posiblemente de la placenta (638), podría actuar como una señal aferente que informa a los circuitos centrales reguladores del metabolismo energético de la necesidad de iniciar la movilización de las reservas adiposas maternas. De acuerdo con esta hipótesis, nuestros resultados muestran que, en el ratón, la ausencia de IL-6 durante la etapa catabólica de la gestación (13-18 d.p.c.) conduce a una disminución de la movilización de los depósitos abdominales maternos.

El sistema IL-6/IL-6R α en la regulación de la homeostasis energética a nivel hipotalámico.

IL-6R α se expresa en diversos núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación del balance energético, donde es activado diferencialmente en respuesta a diversos

estímulos fisiológicos y fisiopatológicos como el ejercicio (611) o la inflamación, respectivamente (621). Sin embargo, el enfoque experimental utilizado en este trabajo fue diseñado para determinar cambios globales en la expresión hipotalámica de este receptor en el ratón gestante y, no para establecer la contribución a una posible acción central de IL-6 durante este estado fisiológico de poblaciones neuronales individuales. Por lo tanto, en un intento de clarificar aún más esta cuestión, hemos analizado el efecto de la ausencia de IL-6 endógena en el perfil gestacional de la actividad transcripcional de los principales sistemas peptidérgicos involucrados en esta función en los núcleos hipotalámicos ARC, PV y el área HL.

El hipotálamo y el tronco encefálico son los principales elementos centrales implicados en el control del balance energético y de la ingesta de alimentos (208). El núcleo ARC, en particular, recibe numerosas señales aferentes de tipo neural y humoral (hormonales y metabólicas) (245) y es considerado como un centro integrador clave de las señales internas que informan del estado energético del organismo, a través de las neuronas productoras de NPY/AgRP y POMC (208). Así, recientemente se ha descrito que IL-6R α se expresa en la mayoría de las neuronas del núcleo ARC y esta citoquina junto con IL-10 regula la función de estas poblaciones neuronales durante el ejercicio, que como se ha mencionado con anterioridad es un conocido activador de la producción central y periférica de IL-6 (611).

Desde la fase intermedia hasta el final de la gestación, en la rata, la ingesta de alimentos aumenta progresivamente como consecuencia del bloqueo de los mecanismos centrales de control del balance energético (419). Es bien conocido que el desarrollo de una resistencia central a las acciones anorexigénicas de leptina y el consecuente aumento de la expresión de NPY/AgRP y disminución del contenido de ARNm de POMC, son el principal mecanismo responsable de la hiperfagia característica de esta etapa gestacional.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que durante la segunda mitad de la gestación, en el ratón, se produce una modulación transcripcional diferenciada de estas poblaciones neuronales. Esto sugiere un posible papel permisivo sobre el desarrollo de la hiperfagia materna de una menor sensibilidad a las acciones de IL-6 en este núcleo hipotalámico, mediada por una menor expresión de su receptor y quizás por una inhibición de la entrada de IL-6 al SNC (435). Así, nuestros datos demuestran que el

aumento exponencial de la tasa de ingesta de alimentos observada desde los 13 hasta los 18 días p.c. es promovido por una reducción del contenido de ARNm de POMC en el núcleo ARC, mientras que la expresión de NPY/AgRP permanece sin cambios. Datos previos de Oberto y cols. (463) avalan la ausencia de una estimulación de la expresión de NPY en este núcleo en ratones gestantes a término, aunque un reciente estudio de Makarova y cols. (464) utilizando como técnica experimental RT-PCR semicuantitativa muestra el efecto contrario, es decir un marcado incremento en los niveles hipotalámicos de ARNm de NPY en esta fase de la gestación. En este trabajo hemos observado que la deficiencia en IL-6 en el ratón, restaura el contenido de ARNm de POMC a los 13 y 18 días p.c., e incrementa los niveles de ARNm de AgRP en la gestación a término, además de estimular la expresión génica de NPY aunque este efecto es evidente únicamente en comparación con animales vírgenes del mismo genotipo. Estos resultados sugieren que, en ausencia de IL-6 durante las últimas etapas de la gestación, tiene lugar un mecanismo compensatorio a nivel de las neuronas productoras de POMC y NPY/AgRP, que permite en cierta manera el mantenimiento de la hiperfagia materna en los animales deficientes en esta citoquina. De hecho, Ropelle y cols. (611) recientemente han demostrado que la inducción por el ejercicio de IL-6 a nivel hipotalámico reduce los niveles de ARNm NPY/AgRP y aumenta la expresión de POMC en el núcleo ARC de ratas con obesidad inducida por la dieta, pero no en animales alimentados con dieta estándar, siendo este efecto dependiente de la producción de IL-10. Además, los estudios de Hidalgo y cols. (169,252) con su modelo de ratón transgénico con sobreexpresión astrocitaria de IL-6, han demostrado que una elevación de la producción de IL-6 a nivel central (encefálico) provoca una menor ganancia de peso en ratones hembra, cuando son alimentados con una dieta normal respecto a sus controles de genotipo salvaje. Este fenotipo está asociado a alteraciones en los niveles de ARNm de NPY/AgRP en el núcleo ARC, que se encuentran reducidos tanto en edades tempranas como en la madurez, además de con un incremento tardío en la expresión de POMC.

El núcleo PV hipotalámico es un componente clave del eje neuroendocrino-inmunológico. Así, este núcleo hipotalámico actúa como un centro integrador fundamental de la señalización al SNC de las citoquinas producidas en la periferia y participa en la acción estimuladora de éstas sobre una amplia variedad de respuestas fisiológicas, neuroendocrinas y conductuales del SNC, entre las que se incluyen por

ejemplo la supresión de la ingesta de alimentos, la termogénesis y la activación de eje HHA. Asimismo, la subunidad alfa del receptor de IL-6 se colocaliza abundantemente con los principales neuropéptidos producidos en este núcleo hipotalámico, como oxitocina, AVP, CRH y TRH (175).

A este respecto, los resultados presentados en esta tesis muestran que, durante la gestación intermedia en el ratón la expresión de TRH se encuentra incrementada en el núcleo PV. Este efecto estimulador de la gestación sobre la transcripción génica de este neuropéptido es bloqueado por la deficiencia de IL-6, que también disminuye la expresión de este neuropéptido durante la etapa inicial de la preñez aunque sólo en comparación con animales vírgenes del mismo genotipo. Estos resultados suponen un hallazgo inesperado teniendo en cuenta que los niveles hipotalámicos de ARNm de POMC se encuentran reducidos en este periodo gestacional y que las neuronas productoras de TRH en el PV están densamente innervadas por α -MSH, que además es un potente estimulador de la expresión y secreción de TRH (256). A pesar del alto nivel de co-expresión de TRH e IL-6R α en el núcleo PV del ratón (175), los trabajos publicados hasta el momento no apuntan hacia un papel de IL-6 como modulador directo de la expresión génica de TRH (175). Sin embargo, es bien conocido que estímulos inflamatorios, como la administración de LPS o IL-1, reducen los niveles de ARNm de prepro-TRH y, estimulan la expresión de CRH y su secreción por el núcleo PV lo que conduce en última instancia a la activación del eje HHA (639,640). De esta manera, nuestros resultados junto con los descritos previamente por otros autores (419,471), sugieren que desde la gestación intermedia hasta la gestación a término, a nivel del núcleo PV, tiene lugar una situación inversa a la detallada anteriormente. Actualmente desconocemos cuál o cuáles serían los mecanismos a través de los cuales IL-6 puede causar este incremento en la expresión de TRH. Sin embargo, como ya mencionamos anteriormente las citoquinas periféricas señalizan al cerebro a través de varias rutas, incluyendo la estimulación de fibras sensorial aferentes del nervio vago cuyas terminaciones residen en distintos órganos de la cavidad abdominal, y que una vez estimuladas transmiten a su vez esta información aferente al centro integrador ubicado en el núcleo del tracto solitario (NTS)(424). El núcleo PV recibe importantes aferencias, principalmente catecolaminérgicas, procedentes de centros integradores localizados en la región inferior del tronco del encéfalo como por ejemplo el NTS (622). Además, se cree que terminales axónicas de neuronas de esta región podrían contribuir

a aproximadamente un 20% de todas las sinapsis en las neuronas productoras de TRH en el PV, siendo estas de carácter excitatorio (256).

Aunque no está claro qué vías median el efecto de IL-6 sobre la expresión de TRH en este estado, es posible especular que otros neurotransmisores como CART cuya producción se activa tras un estímulo inmunológico (639) puedan desempeñar un papel en esta adaptación neuronal. De hecho, CART está presente en abundancia en los axones catecolaminérgicos que establecen sinapsis con las neuronas productoras de TRH en el PV, siendo además un conocido estimulador de la expresión génica TRH en este núcleo y de la acumulación de monoaminas en diversas regiones del cerebro (256).

Aunque queda aún por determinar la importancia funcional de la modulación transcripcional de TRH durante la gestación intermedia, teniendo en cuenta el importante papel de este neuropéptido en la regulación de la homeostasis energética y sus efectos estimuladores sobre la termogénesis (256), podría plantearse como hipótesis que el aumento de su expresión podría actuar como una señal estimuladora de la tasa metabólica basal, cuya elevación es una característica de las últimas etapas de la gestación en el ratón (496). Además, y de acuerdo con esta hipótesis, los resultados presentados en esta tesis demuestran que en ratones IL-6 KO la movilización grasa relativa disminuye durante la fase catabólica de la gestación. Aunque los experimentos de calorimetría indirecta incluidos en este trabajo, y que serán discutidos más adelante, concuerdan igualmente con este supuesto al igual que los datos de composición corporal, como comprobación definitiva sería necesaria la realización en nuestro modelo (ratón IL-6 KO) de pruebas de silenciamiento de la expresión de TRH con ARN de interferencia combinadas con medidas de calorimetría indirecta durante la gestación intermedia.

Como ya se ha descrito en la introducción el AHL es una de las áreas hipotalámicas más extensamente interconectadas. Este hecho permite a esta área hipotalámica participar en la modulación de un amplio espectro de funciones fisiológicas que abarcan desde funciones cognitivas hasta funciones autónomas (243). A lo largo de las últimas décadas se ha estudiado profundamente la participación de las poblaciones neuronales productoras de los neuropéptidos MCH y orexinas localizadas en esta área hipotalámica en la regulación del balance energético y la reproducción (243,245-248). Aunque, como ya mencionamos anteriormente (apartado 5.1 de la introducción) existen discrepancias

en los datos publicados acerca de los niveles de expresión de los precursores de estos neuropéptidos durante la gestación en la rata -niveles aumentados, disminuidos e invariables (436,448,468,470)- no hemos encontrado referencia alguna en la bibliografía de estudios a este respecto en el ratón. A este respecto, nuestros resultados indican que en esta especie animal no se produce cambio alguno en los niveles de ARNm de ambos precursores y que la deficiencia de IL-6 no ejerce efecto alguno sobre los mismos tanto en animales vírgenes como gestantes. Estos últimos datos concuerdan con lo publicado en el modelo murino de sobre-expresión astrocitaria de esta citoquina (252), en el que no se han detectado alteraciones en la expresión hipotalámica de este neuropéptido.

En esta tesis se ha analizado también el efecto de la ausencia de IL-6 endógena sobre las adaptaciones que tienen lugar en los circuitos centrales que regulan el balance energético del organismo durante la lactancia. Al inicio de este trabajo no existían evidencias experimentales que hicieran referencia a la existencia de alteraciones a lo largo de este período del ciclo reproductivo en la producción de esta citoquina bien por el tejido adiposo, o bien procedente de otras fuentes (hipotálamo, hígado, glándula mamaria...), ni en sus niveles circulantes. No obstante, la marcada movilización de las reservas grasas maternas en este estado junto con las características alteraciones en las rutas metabólicas de síntesis de novo y oxidación de ácidos grasos, que son redireccionados hacia la glándula mamaria para la lactogénesis, nos llevaron a hipotetizar que IL-6, al igual que otras adipocitoquinas como leptina cuyos niveles circulantes disminuyen durante la lactancia (517), podría actuar como una señal aferente al hipotálamo que indicase la presencia de un balance energético negativo en este estado.

Aunque por razones metodológicas (escasa sensibilidad de los kits de ELISA comerciales) no disponemos de datos acerca de los niveles plasmáticos de IL-6 durante la lactancia, los resultados recogidos en esta tesis muestran que el incremento en la producción de esta citoquina por el tejido adiposo durante la gestación desaparece tras el parto, mientras que su expresión hipotalámica permanece constante y únicamente se encuentra elevada a nivel hepático en la lactancia intermedia. En este punto temporal, al igual que ocurría en la última etapa de la gestación, la tasa de ingesta alcanza su valor máximo al tiempo que se reduce considerablemente el tamaño de las reservas grasas maternas. En este contexto y contribuyendo a facilitar el desarrollo de la hiperfagia materna, disminuye la sensibilidad a las acciones anoréticas de esta citoquina a nivel central, como refleja el hecho de que la expresión hipotalámica de su receptor se

encuentra inhibida en este periodo de la lactancia, tanto en animales WT como deficientes en esta citoquina.

La lactancia tiene un profundo impacto sobre los mecanismos centrales que regulan el balance energético, dando lugar a cambios en la expresión de los principales neuropéptidos implicados en esta función a nivel del núcleo ARC (526). Así, el incremento de la ingesta en este estado está asociado a una elevación de la expresión de NPY y AgRP, junto a una disminución de los niveles de ARNm de POMC en este núcleo hipotalámico (524-526). La lactancia, en la rata, también resulta en la activación de una población neuronal que expresa NPY en el núcleo DM hipotalámico, que ha sido considerada como crucial para la elevación crónica de la tasa de ingesta materna (241,514). De hecho, se ha descrito que la administración de insulina y/o leptina a ratas lactantes, hasta alcanzar unos niveles circulantes de ambas hormonas similares a los presentes en animales vírgenes, no altera ni la ingesta ni la producción de NPY en este núcleo. Por el contrario, el mismo tratamiento sustitutivo restaura total o parcialmente los niveles basales de expresión de AgRP, NPY y POMC en el núcleo ARC (514). Por tanto el sistema de melanocortinas y NPY localizado en el ARC actuaría como un integrador de las señales aferentes (leptina e insulina) que informan al SNC del estado energético del organismo.

De acuerdo con lo ya descrito (524-526) en la rata, nuestros datos muestran que en el ratón la elevación del contenido de ARNm de NPY en este núcleo se detecta ya a los 7 días p.p. y se mantiene durante la lactancia intermedia, coincidiendo con la elevación de los niveles de expresión de AgRP y la correspondiente reducción de los niveles de ARNm de POMC. Sin embargo, en este estudio no hemos podido detectar señal alguna que verifique que durante la lactancia murina se produzca una activación de las neuronas productoras de NPY en el NDM. Aunque en esta especie dicha población neuronal es activable en respuesta a ciertos estímulos (241,641), éstos parecen no incluir a este estado reproductivo como previamente demostró el grupo de Palmiter y cols. (241). Además, el perfil de expresión hipotalámica de NPY a nivel del núcleo ARC que hemos observado en este trabajo coincide con el descrito por Gammie y cols. (642).

Por otro lado, y de acuerdo con nuestra hipótesis de que una disminución de la sensibilidad a los efectos anorexigénicos de IL-6 (causada por una reducción de la expresión de su receptor) en la lactancia intermedia podría contribuir al mantenimiento

de la hiperfagia materna; el bloqueo de la señalización de IL-6, por la delección de esta citoquina en el ratón, causa un mayor incremento y una mayor inhibición en este núcleo de la expresión de NPY y POMC, respectivamente. Sin embargo la expresión de AgRP parece no verse afectada por la deficiencia de esta citoquina en este estado fisiológico.

Por su parte, a nivel del núcleo PV durante la lactancia tienen lugar profundas adaptaciones en los circuitos neuronales que regulan no sólo el balance energético sino también otras funciones fisiológicas y conductuales como la regulación del eje HHA, la respuesta al estrés y el comportamiento maternal (471,545). Así, el estímulo de succión de las crías incrementa la actividad basal del eje HHA, efecto que parece estar mediado por un aumento de la producción en el PV de AVP y de la sensibilidad de las corticotropas a este neuropéptido. Por el contrario, la expresión de CRH está marcadamente disminuida en este núcleo hipotalámico durante la lactancia en la rata y esta inhibición, junto con la menor sensibilidad hipofisaria a este neuropéptido, se considera como la responsable de la menor respuesta al estrés que se produce durante la lactancia en esta especie. Aunque en el ratón esta atenuación de la activación del eje HHA en respuesta al estrés es menos marcada (545) algunos autores han sugerido que una inhibición de la producción de CRH en este núcleo es un mecanismo adaptativo esencial para el desarrollo de la conducta de protección materna (537). Así, y de acuerdo con estas evidencias experimentales, en este trabajo hemos observado una marcada inhibición de la expresión de este neuropéptido a lo largo de toda la lactancia efecto que no se ve alterado por la ausencia de IL-6. Quizás y dado el efecto de la deficiencia de esta citoquina sobre la expresión de AVP en ratones macho, sería interesante analizar los cambios en el contenido de ARNm de este neuropéptido durante la lactancia en nuestro modelo (251).

En cuanto a TRH, el otro neuropéptido analizado en este núcleo, nos hemos concentrado únicamente en su estudio durante la primera semana de lactancia dado que se había descrito previamente que ésta se ve alterada únicamente en los primeros días de la misma (472). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en la gestación, no hemos detectado efecto alguno ni de la lactancia temprana ni de la ausencia de IL-6 sobre la expresión de este neuropéptido. Dado que el estímulo de succión es un potente estimulador de la producción de TRH, una aproximación metodológica más adecuada para este estudio hubiese sido un paradigma de retirada de crías y restitución de las mismas para poder detectar un posible efecto.

Por último, y dado que el estudio correspondiente a la gestación no ofreció resultados positivos acerca de una posible modulación de la expresión de *pepro-OX* y *MCH* por *IL-6*, decidimos limitar su estudio a la primera semana de la lactancia. Nuevamente no hemos detectado alteraciones en la expresión de estos precursores ni en ratones WT ni *IL-6 KO* con independencia del estado reproductivo.

En resumen, nuestros resultados demuestran que a lo largo del ciclo reproductivo se producen cambios en la sensibilidad a la acción de la *IL-6* endógena a nivel hipotalámico, mediados por una modulación transcripcional de la subunidad de unión al ligando de su receptor (*IL-6R α*). Sin embargo, la aproximación metodológica utilizada en este estudio (determinación de niveles de expresión hipotalámica total cuantificados por PCR en tiempo real), no nos permite discernir cual a cuáles son las poblaciones neuronales afectadas por esta regulación. Aunque se ha intentado la realización de estudios de hibridación *in situ* para dilucidar esta cuestión, los bajos niveles de expresión de este receptor a nivel hipotalámico han hecho imposible su determinación mediante esta técnica. Estudios utilizando fluoróforos, como el Alexa Fluor que aumenta la sensibilidad de la determinación inmunohistoquímica, permitirían resolver esta cuestión como ya han aplicado otros autores para el mismo fin (251). Otra alternativa sería realizar microdissección de núcleos hipotalámicos concretos y la consiguiente determinación de niveles de ARNm por PCR en tiempo real

Una cuestión que todavía no hemos clarificado y que permitiría completar los resultados de esta tesis, es la determinación de los niveles plasmáticos y en LCR de esta citoquina, que nos permitirían clarificar si la *IL-6* periférica podría participar directamente en los cambios observados en la expresión de los principales neuropéptidos implicados en la regulación del balance energético a nivel de central. Lo que si se deduce claramente de nuestros resultados es que la menor sensibilidad a la acción catabólica de esta citoquina tiene un efecto permisivo en el desarrollo de la hiperfagia materna, que es más evidente en etapas tempranas de la gestación, cuando aumenta el depósito de grasa corporal, siendo este efecto menor en etapas posteriores del ciclo reproductivo como la gestación a término y la lactancia intermedia. En ambas fases a pesar del marcado incremento de la ingesta de alimentos, la movilización de los depósitos grasos es máxima, y la deficiencia de esta citoquina produce alteraciones en el patrón de expresión característico de los neuropéptidos *NPY* y *POMC* a nivel del núcleo *ARC*. Por el contrario, en etapas de transición como la gestación intermedia, en las que los niveles

hipotalámicos del receptor de IL-6 son normales, comienza a incrementarse la producción periférica de esta citoquina que podría actuar como una señal aferente al SNC, donde por mecanismos no clarificados en este estudio estimula la expresión de TRH en el núcleo PV, que a su vez podría contribuir a estimular la tasa metabólica basal, activando la lipólisis y la oxidación de las grasas maternas, además de afectar la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón.

El sistema IL6/IL6R α en relación al gasto energético.

Los resultados de composición corporal en nuestro modelo, sugieren que IL-6 puede jugar un papel clave en la gestión de los depósitos energéticos maternos (grasas), aunque la deficiencia de IL-6 no provoca cambios muy marcados en el perfil de consumo de alimentos durante el ciclo reproductivo. Por tanto, era razonable suponer que su acción debería estar centrada en la regulación del gasto energético y/o en los mecanismos asociados a la utilización de los sustratos energéticos por los tejidos periféricos, además de su posterior almacenamiento en el tejido adiposo. Tanto la gestación como la lactancia son dos estados fisiológicos que implican alteraciones reversibles en la capacidad de termorregulación del organismo (643). Así, en la rata la temperatura corporal basal disminuye progresivamente a medida que avanza la gestación, inhibición que se hace significativa únicamente al final de la misma, para luego elevarse marcadamente 4 horas tras el parto (644) manteniéndose incrementada a lo largo de los primeros días de la lactancia (643). Además, durante la gestación a término la respuesta termorreguladora a estímulos como el frío, pirógenos como IL-1 β y prostaglandina E1, se encuentra inhibida. Una respuesta similar se observa durante la lactancia frente a cambios en la temperatura ambiente (frío y calor) (645,646). Es bien conocido además, que la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo marrón, importante órgano productor de calor en respuesta a la actividad termorreguladora del SNA, se reduce en la gestación a término y se mantiene abolida durante la lactancia. Por todo lo ya mencionado, decidimos evaluar el papel de IL-6 en las alteraciones de la capacidad termogénica del TAM, características de ambos estados fisiológicos. A pesar de que IL-6 posee una capacidad pirogénica menor que otras citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 (647), se ha descrito que su sobre-expresión mediante adenovirus a nivel central, resulta en la activación del TAM y consecuente incremento en la producción de UCP-1, efecto que es bloqueado por la denervación adrenérgica local. Además, se ha descrito que su administración i.c.v., en la rata, induce un

incremento del gasto energético y la deficiencia de esta citoquina, en el ratón, da lugar a una reducción de la estimulación del gasto energético en respuesta al frío (174).

Durante la gestación en roedores (493) el TAM sufre un proceso de hipertrofia paralelo al aumento de la tasa de lipogénesis en este tejido (648). Nuestros resultados demuestran que la ausencia de IL-6, en el ratón, provoca un mayor incremento del peso de este tejido, en la gestación a término, además de un mayor acúmulo lipídico en el mismo, que es evidente ya en la gestación intermedia. Estos resultados sugieren que la deficiencia de esta citoquina durante la gestación en el ratón, conduce a una menor actividad de este tejido y concuerdan con las evidencias experimentales que demuestran que este modelo animal presenta una menor respuesta termogénica a estímulos como el frío o el estrés (174). Así, la expresión de IL-6, al igual que la de su receptor, se ve incrementada durante la gestación intermedia de modo similar a lo que ocurre en otros modelos en los que se produce un proceso de atrofia funcional del TAM, asociada a un incremento del tamaño y del acúmulo lipídico en el mismo (597). Estos datos sugieren por tanto, el desarrollo de un estado inflamatorio en este tejido que podría justificar la posterior pérdida de funcionalidad del mismo en la gestación a término. Otra de las razones por las que la producción local de IL-6 podría estar incrementada en la gestación intermedia sería un incremento de la actividad simpática en este tejido. Así, se ha descrito que el tratamiento de cultivos primarios de adipocitos marrones con NA causa un fuerte incremento de la expresión y secreción de esta citoquina (649). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que una mayor señalización adrenérgica en este tejido no debería ser el mecanismo responsable de la inducción de la expresión de IL-6 durante la gestación intermedia, dado que la relación de los niveles de ARNm de los receptores adrenérgicos $\alpha 2/\beta 3$ se encuentra elevada en este periodo gestacional. Además la expresión de distintos genes implicados en el programa termogénico, cuya transcripción es dependiente de los niveles de AMPc, como la deiodinasa-2, PGC-1 α y PPAR γ (345), se encuentra inhibida en el TAM de ratones gestantes a los 13 días p.c. Por otro lado, esto confirma que al igual que ocurre en el caso de leptina, cuya producción por los adipocitos marrones también se incrementa durante la gestación intermedia, la modulación de la expresión de IL-6 en este tejido está fundamentalmente asociada a cambios en el contenido lipídico del mismo (493,650). La capacidad termogénica del TAM está íntimamente relacionada con el grado de diferenciación del mismo, además de depender de múltiples factores entre los que se encuentran la

densidad mitocondrial y los niveles de expresión de genes termogénicos tejido-específicos como UCP-1 (304). Por ello, decidimos analizar el papel de IL-6 en las alteraciones que tienen lugar durante la gestación en estos parámetros. UCP-1 no sólo se ha considerado como un marcador del grado de diferenciación del TAM, sino que también es determinante crucial de su actividad termogénica, a través de su capacidad de inducir el desacoplamiento mitocondrial (304). UCP-3, otra proteína desacoplante de la familia de UCP-1, se expresa fundamentalmente en músculo esquelético y TAM, aunque su papel en la disipación de energía en forma de calor es objeto de debate (363,364). Así, se ha considerado más bien como un transportador de aniones, fruto del metabolismo de los ácidos grasos, que frenaría el daño mitocondrial generado por una acumulación excesiva de estas especies. Como ya se mencionó en la introducción, en la rata, el perfil de expresión transcripcional de ambas proteínas en el TAM a lo largo de la gestación ya había sido descrito previamente por varios autores (493,558,651). De esta manera, ésta alcanza su máximo a los 13 días p.c. para luego mostrarse marcadamente inhibida en la gestación a término. Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran un perfil similar de expresión proteica y transcripcional de estas proteínas en el TAM del ratón durante la gestación. Sin embargo, la relevancia funcional del aumento de la producción de UCP-1 y UCP-3 en el TAM durante la gestación intermedia no está del todo esclarecida, habiéndose sugerido, en el caso de la segunda, su relación con un incremento en la utilización de ácidos grasos como sustrato metabólico por el TAM (493). De hecho, se ha descrito que la captación de glucosa por los adipocitos marrones se encuentra disminuida durante la gestación intermedia en la rata (652) y se ha hipotetizado que el incremento de la producción de leptina en este tejido podría ser el causante de esta situación al favorecer el desarrollo de resistencia a la insulina (493). Por tanto sería lógico suponer que de manera análoga IL-6 podría contribuir al bloqueo de las vías de señalización de insulina en este tejido. Sin embargo, no hemos encontrado datos en la bibliografía referentes a la evolución de la expresión de UCP-1 y UCP-3 en las dos primeras semanas de la gestación en el ratón. Únicamente un artículo del grupo de Villarroya y cols. (559), que incluye en su estudio el último día de gestación y la lactancia, indica que la reducción en la producción de ambas proteínas en el TAM sólo es observable tras el parto. Esta discrepancia con nuestros resultados podría ser debida al uso de diferentes cepas de ratones en ambos estudios (ratones Swiss frente a los C57BL6 empleados en esta tesis).

Curiosamente la deficiencia de IL-6 anula el perfil de cambio observado en la expresión de UCP-1 y UCP-3 durante este estado fisiológico, lo que sugiere que la IL-6 producida a nivel local en el TAM podría participar de manera autocrina/paracrina en la modulación de la capacidad termogénica de este tejido, como sugiere el incremento paralelo de la expresión de su receptor en ratones gestantes a los 13 días p.c.

Llegados a este punto nos planteamos si IL-6 podría ejercer algún papel en la modulación de la función mitocondrial del TAM durante la gestación. En este proceso juegan un papel crucial tanto PGC-1 α como su homólogo PGC-1 β , que ejercen funciones complementarias aunque difieren en su regulación transcripcional por AMPc (599). Como ya se mencionó en la introducción PGC-1 α fue identificado inicialmente como co-activador transcripcional de PPAR γ , que no sólo modula la expresión de UCP-1 sino que juega un papel relevante en el proceso de diferenciación adipocitaria y en la modulación de la sensibilidad tisular a la insulina. Tanto PGC-1 α como PGC-1 β modulan la expresión y la actividad de factores de transcripción mitocondriales como: NRF-1, que regula genes asociados a la cadena respiratoria; y ERR α , que regula genes implicados en la oxidación de ácidos grasos (CPT-1, MCAD-1...) y en la cadena de transporte electrónico (653).

Curiosamente nuestros resultados muestran que durante la primera semana de gestación en el ratón se produce un incremento de la expresión en el TAM de ERR α a pesar de que los niveles de ARNm de PGC-1 α se encuentran marcadamente reducidos mientras que la expresión de su homólogo, PGC-1 β , permanece constante. A este respecto existe poca información acerca de los factores implicados en el control de la expresión génica de este receptor (600,654). Aunque sus principales moduladores transcripcionales son los otros dos miembros de su familia de receptores (ERR β y γ), se ha demostrado que la expresión del gen de ERR α es estimulado por estrógenos en tejidos con alta capacidad oxidativa como el músculo cardíaco (600), siendo este efecto mediado por su receptor ER α . Sin embargo los niveles circulantes de estradiol no se elevan hasta el final de la gestación y, únicamente se observa un incremento de la producción ovárica de progesterona y de sus niveles plasmáticos en la primera semana de esta etapa del ciclo reproductivo (634). Progesterona parece tener un profundo impacto sobre el metabolismo adiposo y al igual que los estrógenos parece ejercer acciones pro-adipogénicas (655-658). Además, adipocitos marrones en cultivo tratados con estradiol

y progesterona presentan un mayor número y tamaño de gotas lipídicas y una morfología más diferenciada (659). Teniendo en cuenta que estudios recientes han demostrado que $ERR\alpha$ podría estimular la adipogénesis favoreciendo la acumulación de triglicéridos y la elevación de la expresión de distintos marcadores adipogénicos (660,661) podría hipotetizarse que la elevación de los niveles circulantes de progesterona en la primera semana de gestación podrían favorecer el crecimiento y desarrollo del TAM a través de un efecto estimulador sobre la expresión de $ERR\alpha$. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que detectemos un incremento en el contenido de grasas neutras en el TAM durante la gestación intermedia. Por otro lado, en esta fase de la preñez, en el ratón, la ratio $\alpha2/\beta3$ se encuentra elevada, lo que justifica aún más el mayor acúmulo de lípidos en este tejido y tal como mencionamos antes, el incremento de la producción de IL-6.

A la luz del incremento en los niveles de ARNm de IL-6 en el TAM podría considerarse, como ya mencionamos anteriormente, que la gestación intermedia induce un estado de inflamación en este tejido. En esta etapa, la expresión de $PPAR\gamma$ y su coactivador $PGC-1\alpha$ se encuentra inhibida en el TAM. Esto concuerda no sólo con el incremento de la relación entre la expresión de los receptores adrenérgicos $\alpha2/\beta3$, sino también con una mayor infiltración por macrófagos del TAM (597). Así, se ha demostrado que la activación de este tipo celular del sistema inmune en respuesta a distintos estímulos como el tratamiento con LPS, en dosis capaces de inducir una elevación de la expresión de IL-6, resulta en una reducción de su producción de $PPAR\gamma$ (662). Además, los niveles de ARNm $ERR\alpha$, también presente este tipo celular del sistema inmune, aumentan en respuesta a este mismo tratamiento. De ser cierta esta hipótesis inflamatoria, esto justificaría el incremento no sólo de la expresión de $ERR\alpha$, a la que contribuye además el aumento en la producción de $PGC-1\beta$, sino también de NRF-1. Así, se ha descrito que la inflamación inducida por LPS es capaz de estimular la expresión de NRF-1 en hepatocitos y este efecto es mediado a través de elementos de respuesta para NFK- β en el promotor de su gen (663). Estos datos indicarían un incremento temporal de la mitocondriogénesis que justificaría el incremento en la expresión de UCP-1 y UCP-3 observada en nuestro estudio. A este respecto Trayhurn y cols. (664) en su detallado estudio de la actividad termogénica del TAM interescapular durante la gestación en el ratón no encontraron cambios en la actividad de la enzima

citocromo-oxidasa, indicador indirecto del contenido mitocondrial de este tejido. Sin embargo en ese estudio se ha utilizado una cepa de ratones diferente (ratones Aston) a la empleada en nuestro trabajo.

En ausencia de IL-6 durante la gestación intermedia, el perfil de regulación de la expresión de PGC-1 β y de los factores de transcripción nucleares antes mencionados, NRF-1 y ERR α , se anula o se encuentra significativamente atenuada en el TAM. Esto justificaría, en cierta medida, que los ratones deficientes en IL-6 mantengan un nivel de producción prácticamente constante de las proteínas desacoplantes UCP-1 y UCP-3 durante la gestación en este tejido. Por otro lado, y teniendo en cuenta que ERR α estimula la producción de enzimas de gran relevancia en el proceso de oxidación mitocondrial de ácidos grasos, la ausencia de modulación de esta enzima en ratones IL-6 KO podría ser la causante de que estos animales presenten un mayor acúmulo lipídico a este nivel.

Por último, en la gestación a término, los efectos del proceso de inflamación que tiene lugar en este tejido desde los 13 días p.c. se hacen evidentes en la presencia de una clara hipertrofia y una marcada inhibición de la producción de UCP-1 y UCP-3. Todos estos elementos concuerdan con un fenómeno de transdiferenciación del TAM (304,311,597) que justifica su pérdida de funcionalidad como ya ha sido ampliamente demostrado por otros autores utilizando como modelo experimental la rata (493,558,651).

La siguiente pregunta que nos planteamos tras el análisis detallado durante la gestación de los diferentes marcadores moleculares de la capacidad termogénica del TAM, fue si los cambios observados en la expresión de estos factores a nivel de este tejido, en presencia y en ausencia de IL-6, se correlacionaban con alteraciones en el gasto energético total del organismo. Para ello, realizamos medidas de calorimetría indirecta en ratones de ambas cepas (WT e IL-6 KO) a los 7 y 13 días de gestación. Como ya se explicó en el apartado 6.5 de resultados, hemos intentado prolongar este estudio hasta el último día de gestación, pero diversas razones metodológicas hicieron imposible la realización de estas medidas. El equipo empleado para estas determinaciones nos permitía analizar simultáneamente no sólo el gasto energético total sino también otros parámetros como el coeficiente respiratorio RER y los distintos componentes de la actividad locomotora del animal (actividad espontánea, de alta frecuencia y los movimientos verticales). Así, y de acuerdo con la ausencia de cambios en la expresión

en el TAM de las proteínas desacoplantes UCP-1 y UCP-3 durante la primera semana de gestación, no hemos observado efecto alguno ni de la gestación ni de la deficiencia de IL-6 sobre el gasto energético en esta etapa. Actualmente no hay estudios disponibles en la bibliografía en los que se haya analizado mediante calorimetría indirecta esta etapa de la gestación en el ratón. Únicamente Trayhurn y cols. (665) utilizando como modelo experimental el hámster dorado hicieron un seguimiento del GE y el RER a lo largo de todo el periodo gestacional. Este modelo animal a diferencia del ratón y de la rata no desarrolla un fenotipo hiperfágico durante la gestación. De acuerdo con nuestros resultados en este estudio no se detectaron cambios con respecto a animales vírgenes, ni en el GE ni en el RER, a lo largo de la primera semana de gestación. Como ya mencionamos en el correspondiente apartado de resultados la gestación afecta al comportamiento alimenticio, no sólo en la fase de consumación sino también en la anticipativa, incrementando el acaparamiento de alimentos y la actividad exploratoria en la búsqueda de los mismos (602). De esta manera, los resultados de la presente tesis muestran que en esta etapa de la gestación en el ratón, incrementa la actividad locomotora total y en el plano horizontal, coincidiendo con la fase nocturna del ciclo en la que se produce una mayor ingesta alimentos. Aunque los animales deficientes en IL-6 no presentan un aumento de la actividad locomotora total, si observamos un efecto estimulador significativo de los movimientos verticales, que podrían asociarse al mayor incremento de la tasa de ingesta observada en este modelo animal durante esta etapa.

En la gestación intermedia, en concordancia con la mayor producción de las proteínas UCP-1 y UCP-3 además del aumento de la expresión de factores de transcripción nucleares clave en el desarrollo de la función mitocondrial, se produce un marcado incremento del GE basal en valor absoluto, es decir sin corregir por el peso corporal ni por la masa magra del animal. Este efecto se anula al corregir este parámetro por peso corporal del animal. De nuevo, nuestros resultados son similares a los previamente descritos por otros autores (496,665) y que apuntan hacia un incremento de la tasa metabólica basal en la última fase de la gestación en roedores. Por el contrario, en ausencia de IL-6, aunque el GE basal se mantiene elevado en la fase diurna del ciclo luz: oscuridad, éste regresa a los valores basales durante la fase nocturna. La corrección por el peso corporal, sin embargo, muestra un GE significativamente inhibido durante las horas de oscuridad. Estos resultados en conjunto estarían de acuerdo con la mayor ganancia de grasa corporal observada en los ratones IL-6 KO durante la gestación. Sin

embargo no hemos podido detectar alteraciones en el RER en ratones WT ni IL-6 KO durante esta etapa gestacional. No obstante, Trayhurn y cols. (665), en su detallado estudio de la bioenergética de la gestación en el hámster, detectan una disminución de este coeficiente desde este punto temporal hasta el final de la misma. La causa de esta discrepancia podría radicar en el hecho de que, como ya mencionamos, en el hámster gestante no se produce un incremento de la tasa de ingesta como en el ratón, y esta especie depende fundamentalmente de la oxidación de sus reservas grasas para llevar a cabo con éxito la gestación. Por último, con respecto a la actividad locomotora, el incremento tanto en su media total como en la actividad correspondiente al plano horizontal, se observan ya en la fase diurna del ciclo en ambos genotipos, lo que concuerda con un aumento de la actividad exploratoria en busca de alimentos. Sin embargo, con respecto a la actividad en el plano vertical, este incremento está presente únicamente en los ratones gestantes IL-6 KO, adelantándose igualmente a la fase diurna del ciclo.

Al igual que la gestación, la lactancia supone un modelo de atrofia funcional del TAM (560). En este estado, tanto en ratas como en ratones, se produce un marcado descenso del contenido mitocondrial de este tejido junto a una menor conductancia de protones a través de la membrana mitocondrial (561,651,666). Sin embargo, la principal diferencia entre ambas especies en cuanto al desarrollo de este proceso de atrofia, se centra en la propia morfología del tejido que, reduce significativamente su tamaño en ratas en período de lactancia mientras que se mantiene hipertrofiado en el ratón hasta el destete (560). De acuerdo con estas evidencias experimentales aunque no hemos detectado un mayor peso del TAM en la lactancia temprana, éste se incrementa marcadamente y de manera similar en la lactancia intermedia tanto en ratones WT como IL-6 KO. Por tanto, y a diferencia de lo que ocurría en el caso de la gestación, IL-6 parece no estar implicada en este proceso de hipertrofia. Prueba de ello es que los niveles de expresión en este tejido de IL-6 y de su receptor no se modifican ni a los 7 y ni a los 14 días p.p., y son similares a los observados en ratones vírgenes. Además y coincidiendo con la reducción del número de mitocondrias, principal responsable de la atrofia funcional del TAM, la expresión de las proteínas desacoplantes UCP-1 y UCP-3 se encuentra marcadamente inhibida. Este efecto ocurre nuevamente de manera similar en ratones WT e IL-6 KO, lo que indica que IL-6 parece no estar implicada en la regulación de la capacidad termogénica del TAM durante la lactancia. Puesto que la regulación de la

actividad de UCP-1 en el TAM tiene lugar fundamentalmente a nivel transcripcional (304) y no hemos detectado diferencias entre genotipos en los niveles de ARNm de proteínas desacoplates, este estudio no se extendió al análisis de los niveles proteicos de las mismas durante la lactancia. Así, la disminución de la actividad simpática en el TAM, que juega un papel central en su crecimiento y diferenciación, se considera el principal evento regulador que conduce a la inhibición de la expresión génica de UCP-1, siendo ésta probablemente la principal causa de la atrofia funcional de este tejido en animales lactantes (559,560).

El sistema IL-6/IL-6R α en la regulación del metabolismo lipídico

Una vez finalizado el análisis en nuestro modelo de los dos extremos de la ecuación del balance energético, es decir la ingesta y el gasto energético, únicamente podíamos concluir que el mayor depósito de grasas observado en animales deficientes en IL-6 a lo largo del ciclo reproductivo podía estar relacionado con alteraciones en ambos durante el periodo de gestación. Sin embargo, el tamaño de las reservas grasas del organismo depende además de ambos factores (ingesta/gasto), de la metabolización de los sustratos energéticos y de la gestión del almacenamiento de sus excedentes o lo que es lo mismo del grado de “distribución” energética (*nutrient partitioning*) entre los distintos órganos y tejidos del organismo (1,418). Así, los datos de composición corporal junto con los elevados niveles circulantes de triglicéridos en ratones IL-6 KO gestantes, en ausencia de otras alteraciones del perfil bioquímico basal durante el ciclo reproductivo, sugieren que la deficiencia de esta citoquina provoca una alteración en las rutas del metabolismo de los lípidos en ambos estados fisiológicos. Por su parte, tanto la gestación como la lactancia implican profundas adaptaciones en el metabolismo de las grasas materno, que están directamente relacionadas con los intensos requerimientos de sustratos metabólicos para sustentar el desarrollo fetal y la producción de leche (418,509,603,604). Dichas adaptaciones se centran además de en la glándula mamaria en el hígado y tejido adiposo que junto con ella son los principales tejidos lipogénicos del organismo. Todas estas evidencias experimentales sugieren que IL-6 podría ejercer un papel fundamental en el desarrollo de estas alteraciones del metabolismo lipídico. Por ello decidimos analizar en detalle la expresión en ambos tejidos de enzimas clave tanto en los procesos de captación de triglicéridos, lipólisis, síntesis de *nov*o y oxidación de ácidos grasos a lo largo del ciclo reproductivo.

Nuestros resultados muestran que durante la segunda mitad de la gestación en el ratón se produce un incremento de la expresión a nivel del tejido adiposo no sólo de IL-6 sino también de su receptor. Estos datos concuerdan con recientes estudios que muestran similares resultados con esta y otras citoquinas como TNF α y MCP-1, implicadas en el desarrollo del proceso inflamatorio (435,667). Por ello se ha considerado que la gestación a término, al igual que la obesidad, supone un estado de inflamación subclínica tanto sistémica como a nivel del tejido adiposo. A este respecto es bien conocido que el proceso inflamatorio bloquea la señalización de insulina tanto a nivel central como periférico (173,611,612), siendo IL-6 junto a TNF α e IL-1 sus principales mediadores. De hecho una de las principales características de la gestación son los cambios en la sensibilidad a esta hormona en los tejidos maternos (430,434,473,475), que son determinados fundamentalmente por la necesidad del aporte de glucosa al feto, e influyen marcadamente el metabolismo lipídico materno a nivel del tejido adiposo. Así, en la rata en la primera semana de gestación, el incremento de la sensibilidad a insulina a este nivel causa un aumento de la tasa de incorporación de glucosa en ácidos grasos y una inhibición de la lipólisis (430) que, junto con el incremento de la tasa de ingesta, determinan el crecimiento del depósito graso materno. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en el ratón el mayor almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo es debido a un marcado incremento de la expresión de LPL, enzima que cataliza la captación por el adipocito de los ácidos grasos contenidos en los lípidos circulantes (véase introducción apartado 4.2.2). Así, y a diferencia de lo que ocurre en la rata, la ausencia de cambios en la expresión de LSH y las enzimas lipogénicas ACC y FAS indican que, en este periodo la tasa de lipólisis permanece constante y no se produce una mayor síntesis de novo de ácidos grasos. Por tanto, nuestros resultados muestran que el aumento del contenido de grasa abdominal durante esta etapa gestacional sería debido a un incremento del depósito de los lípidos procedentes de la dieta. Prueba de ello, es la inhibición de la ratio de expresión LSH/LPL en el TAB, que se considera un indicador de la relación entre la degradación y el almacenamiento de triglicéridos en el mismo (476). Entre las posibles causas del incremento en la expresión de LPL, se encuentran tanto el incremento de la sensibilidad a la insulina como el aumento de la tasa de ingesta dado que, como es bien conocido, LPL es regulada transcripcionalmente tanto por insulina como por el estado nutricional (668,669). En este contexto resulta interesante el hecho de que, aunque en esta fase de la gestación los niveles de ARNm de IL-6 en el TAB todavía no se encuentran elevados, la

deficiencia de esta citoquina normaliza la relación entre captación y movilización de triglicéridos. Ante esta situación, un incremento de la síntesis de novo de ácidos grasos en el TAB, como indican los elevados niveles de expresión de ACC-1 y FAS en los ratones IL-6 KO gestantes, sería el responsable del mayor acúmulo de grasa en este modelo animal. Así, nuestros resultados concuerdan con datos previos de otros autores que demostraron un efecto inhibitorio de la delección de esta citoquina sobre la fosforilación de AMPK, cuya inactivación no sólo estimula la actividad de ambas enzimas sino también su expresión, tanto en el TAB como a nivel hepático (184).

Una vez alcanzada la mitad del periodo gestacional, el perfil metabólico materno sufre un cambio drástico decantándose hacia una movilización de los triglicéridos acumulados para su utilización como fuente de energía. Esta situación es causada por el desarrollo de un estado de resistencia a la acción de la insulina en los tejidos maternos que favorece de esta manera el flujo de glucosa al feto (426,479). Al igual que en la rata (476), en el ratón, este fenómeno es mediado por un incremento de la expresión de la enzima LSH en el TAB, que cataliza la conversión de los triglicéridos a ácidos grasos libres (388). Sin embargo, nuestros resultados muestran que en el ratón tanto la captación como la síntesis de novo de ácidos grasos en el TAB, medidas en función de la expresión de LPL y FAS, se encuentran ya inhibidas en esta etapa gestacional. Por el contrario, estas alteraciones metabólicas en la rata son detectables únicamente en los días previos al parto (476,604). Todos estos factores marcan el inicio de la etapa catabólica de la gestación que implica una mayor movilización frente a la captación de triglicéridos, y coincide con el incremento de la expresión de IL-6 en el tejido adiposo materno. La delección de esta citoquina en este punto temporal del periodo reproductivo anula los cambios en la expresión de LSH y FAS, y atenúa la inhibición de LPL. Todo ello se traduce en un bloqueo de la movilización de las reservas grasas maternas y en una normalización de la síntesis de novo de ácidos grasos, lo que favorece en conjunto que las reservas grasas maternas permanezcan estables. De esta manera, nuestros resultados muestran claramente que el incremento de la producción de IL-6 en el TAB murino durante la gestación intermedia podría ser la responsable de la activación de la lipólisis, a través de su efecto estimulador sobre la expresión de LSH, y de la inhibición de la captación de ácidos grasos, gracias a su acción inhibitoria sobre la expresión de LPL. Así y de acuerdo con estos resultados, se ha descrito que en roedores el tratamiento con IL-6 *in vivo* e *in vitro* ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad y la

expresión de LPL en este tejido (178) y que en humanos la administración i.v. de IL-6 revierte la reducción de la expresión adipocitaria de LSH característica de la diabetes tipo II (179). Además, aunque no se ha evaluado en esta tesis, otra de las vías por las que IL-6 podría actuar sobre la captación de ácidos grasos en el TAB de la madre gestante sería la modulación de la expresión de ASP. De esta manera, se ha descrito que la producción de esta proteína, que media la síntesis de triglicéridos a partir de diacilglicéridos en el TAB, se encuentra elevada en ratones IL-6 KO antes y después del desarrollo de obesidad (181).

En la gestación a término, nuestros resultados muestran que la expresión de LSH en el TAB se mantiene elevada y a diferencia de lo que ocurre en la rata, la expresión de LPL retorna a los valores observados en animales no gestantes (476). Coincidiendo con este perfil de mayor movilización de reservas grasas, se produce además una elevación de los niveles de ARNm de CPT-1 α y este perfil oxidativo en el adipocito materno es bloqueado por la ausencia de IL-6. Estos resultados indican que los elevados niveles de expresión de IL-6 en el TAB durante la gestación a término podrían contribuir al incremento de la utilización de las reservas grasas maternas como fuente de energía. De hecho, es bien conocido que, la administración de IL-6 en humanos incrementa la tasa de oxidación global de ácidos grasos (180) y que la deficiencia de IL-6 en ratón está asociada a un incremento del coeficiente respiratorio (205) lo que indica un uso preferente de hidratos de carbono frente a grasas como sustrato metabólico para el sustento de las funciones orgánicas. Además, IL-6 es un importante modulador del metabolismo lipídico muscular de tal manera que, el incremento de su producción a este nivel durante el ejercicio físico estimula la β -oxidación incrementando la sensibilidad a la insulina en este tejido (619). Prueba de ello es que, el tratamiento de miotubos en cultivo y de explantes de tejido muscular esquelético con esta citoquina incrementa la tasa de oxidación de ácidos grasos de cadena larga como el palmitato (670).

Tras el parto la carga metabólica materna es mayor aún si cabe, de tal manera que, en la lactancia intermedia se produce una marcada reducción del contenido de grasa abdominal (509). De hecho, en la rata, a pesar del masivo incremento de la ingesta, la captación de ácidos grasos por el TAB materno disminuye progresivamente. Este efecto es mediado por una disminución de la expresión y actividad de LPL (476), mientras que los niveles de ARNm de LSH permanecen invariables, lo que se traduce en el mantenimiento de una ratio LSH /LPL elevada. Nuestros resultados muestran que, en el

ratón, este perfil se reproduce únicamente en la etapa intermedia de la lactancia. En este punto del ciclo reproductivo a pesar de la ausencia de cambios en la producción de IL-6, la delección de esta citoquina reduce la tasa de movilización de las reservas grasas, a través de la inhibición de la transcripción génica de LSH. Por tanto, estos resultados sugieren que al igual que en la gestación, IL-6 actúa como un importante modulador de la lipólisis durante la lactancia. Por otro lado, la ampliamente descrita inhibición de la lipogénesis en el TAB durante la lactancia intermedia, medida en función de la expresión de ACC-1 y FAS (603,604), es revertida por la deficiencia de IL-6 lo que contribuye al mayor contenido de grasa abdominal que mantienen los ratones IL-6 KO en este periodo. Por último la deficiencia de IL-6 causa una inhibición de los niveles de ARNm de CPT-1 α en este tejido, que concuerda con el efecto estimulador de esta citoquina sobre la β -oxidación (619), y contribuye al ya mencionado mantenimiento de las reservas grasas maternas en los animales IL-6 KO en una situación general en la que se produce un marcado incremento de las demandas energéticas.

Como conclusión de este estudio y a la luz del profundo impacto que IL-6 parece ejercer durante todo el ciclo reproductivo sobre la gestión de los depósitos grasos del organismo y las principales rutas del metabolismo lipídico en el TAB, decidimos evaluar su posible papel en la modulación de las mismas a nivel hepático. Este órgano además de actuar en cierta medida como un gestor de los niveles de lípidos circulantes, participa en la oxidación de los ácidos grasos generando cuerpos cetónicos en situaciones de demanda energética. Nuestros resultados indican que tanto durante la gestación, especialmente en su última etapa, como durante la lactancia, se produce un incremento del contenido lipídico en este tejido, que lleva asociado una elevación de la producción de IL-6 y de su receptor. Durante la gestación intermedia esta citoquina parece ejercer un papel fundamental en la modulación de la capacidad oxidativa mitocondrial a este nivel. De esta manera, el incremento en la expresión de CPT-1 α que parece estar inducido por el aumento de la producción de IL-6, favorecería la reducción del contenido de lípidos en el hígado en la gestación a término. En esta última etapa de la preñez, la capacidad oxidativa del hígado se encuentra significativamente reducida, como se refleja en la reducción de la expresión de CPT-1 α , observada en este trabajo y descrita previamente por otros autores (671), además de otros genes implicados en el proceso de β -oxidación como PPAR γ , ACO, etc. y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Este fenómeno se ha postulado como una posible causa del desarrollo

del hígado graso durante la gestación (605). De esta manera en la gestación a término, aunque en menor medida que en ciertas patologías asociadas a una disfunción mitocondrial como el síndrome de Reye, el hígado sufre un proceso de esteatosis microvesicular cuyo posible origen podría estar relacionado con un incremento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (672). Por otro lado, la deficiencia de IL-6 bloquea la elevación de los niveles hepáticos de ARNm de CPT-1 α en la gestación intermedia, lo que podría justificar el mayor acúmulo de lípidos en este tejido en los ratones IL-6 KO durante la gestación a término. Aunque estos animales presentan unos niveles de CPT-1 α normales en esta etapa de la preñez, la β -oxidación depende, además del transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria, del correcto funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En esta ruta metabólica juega un importante papel la deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena media, que tal y como se ha descrito recientemente, se encuentra inhibida transcripcionalmente en el hígado de ratones IL-6 KO (195) lo que podría contribuir a mantener el alto contenido de lípidos en el hígado de estos animales durante la gestación a término.

Finalmente durante la lactancia aunque observamos el típico patrón de aumento de la expresión de enzimas lipogénicas (ACC-1 y FAS) a nivel hepático (603), este efecto parece no ser mediado por el incremento de la producción de IL-6 observado en la lactancia intermedia, puesto que la delección de esta citoquina no tiene efecto alguno sobre la misma. Sin embargo, el mayor contenido de grasas neutras en los ratones IL-6 KO durante este periodo sugiere que IL-6 podría actuar como un factor modulador del mismo, estimulando otros elementos de la ruta de oxidación de ácidos grasos como la DACM-1 y protegiendo al organismo materno del desarrollo de esteatosis hepática.

En conjunto los resultados de la presente tesis indican que IL-6 juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis energética durante la gestación y la lactancia regulando a nivel central y periférico la ingesta y el gasto energético, y modulando la capacidad termogénica del TAM y la gestión de las reservas grasas del organismo, tanto a nivel del TAB como del hígado.

CONCLUSIONES

IL-6 interviene en la regulación de la homeostasis energética durante la gestación y la lactancia a través de distintos mecanismos:

- El incremento de la ingesta y del depósito graso observado durante la fase inicial de la gestación es favorecido por una disminución de la sensibilidad hipotalámica a IL-6 que ejerce además, un efecto permisivo sobre el desarrollo de la hiperfagia materna tanto en la gestación a término como en la lactancia intermedia. Esta acción del sistema IL-6/IL-6R α se refleja en una modulación diferencial de la expresión de los neuropéptidos NPY/AgRP y POMC en el núcleo ARC.
- El restablecimiento de la sensibilidad hipotalámica a IL-6, junto con una mayor producción periférica de la misma, parecen contribuir al aumento de la expresión de TRH a nivel del núcleo PV hipotalámico, durante la gestación intermedia.
- El sistema IL-6/IL-6R α interviene en la estimulación de la actividad termogénica del TAM y el gasto energético durante la gestación intermedia, efecto que es mediado por UCP- 1 y 3 y los factores de transcripción mitocondriales NRF-1 y ERR α .
- A nivel del TAB, IL-6 participa en la modulación del metabolismo lipídico en las fases de mayor demanda energética del ciclo reproductivo:
 - activando en la fase intermedia de la gestación la hidrólisis de los triglicéridos almacenados en el adipocito y favoreciendo su oxidación al término de la misma
 - inhibiendo la captación y síntesis de novo de ácidos grasos durante la lactancia intermedia
- El incremento de la expresión del sistema IL-6/IL-6R α a nivel hepático durante la gestación intermedia, reduce la acumulación de triglicéridos en este tejido; lo que podría constituir un mecanismo de protección del organismo materno frente al desarrollo de esteatosis hepática.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. Keesey RE, Powley TL. Body energy homeostasis *Appetite* 2008; 51: 442-445.
2. Mrosovsky N. Regulatory extremes in hibernators and hibernation-like symptoms in man *J Psychosom Res* 1970; 14: 239-246.
3. Jones JE, Corp ES, Wade GN. Effects of naltrexone and CCK on estrous behavior and food intake in Syrian hamsters *Peptides* 2001; 22: 601-606.
4. Schneider JE. Energy balance and reproduction *Physiol Behav* 2004; 81: 289-317.
5. Marin-Bivens CL, Kalra SP, Olster DH. Intraventricular injection of neuropeptide Y antisera curbs weight gain and feeding, and increases the display of sexual behaviors in obese Zucker female rats *Regul Pept* 1998; 75-76: 327-334.
6. Perello M, Spinedi E. [Neuroendocrine aspects of obesity] *Medicina (B Aires)* 2004; 64: 257-264.
7. Friedman N, Fanning EL. Overweight and obesity: an overview of prevalence, clinical impact, and economic impact *Dis Manag* 2004; 7 Suppl 1: S1-S6.
8. Palou A, Bonet ML, Pico C, Rodriguez AM. [Nutrigenomics and obesity] *Rev Med Univ Navarra* 2004; 48: 36-48.
9. Chaptini L, Peikin S. Neuroendocrine regulation of food intake *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 223-229.
10. Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetic factors in human obesity *Obes Rev* 2007; 8 Suppl 1: 37-40.
11. Loos RJ, Bouchard C. Obesity--is it a genetic disorder? *J Intern Med* 2003; 254: 401-425.
12. Bray GA. Afferent signals regulating food intake *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 373-384.
13. Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins *J Neurosci* 2002; 22: 9048-9052.
14. Wren AM, Bloom SR. Gut hormones and appetite control *Gastroenterology* 2007; 132: 2116-2130.
15. Erlanson-Albertsson C, York D. Enterostatin--a peptide regulating fat intake *Obes Res* 1997; 5: 360-372.
16. Lieveverse RJ, Jansen JB, Masclee AA, Lamers CB. Bombesin reduces food intake after a preload in man by a cholecystikinin-independent mechanism *Clin Sci (Lond)* 1993; 85: 277-280.

17. Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats *J Comp Physiol Psychol* 1973; 84: 488-495.
18. Lieveverse RJ, Jansen JB, Lamers CB. Cholecystokinin and satiation *Neth J Med* 1993; 42: 146-152.
19. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1 *Physiol Rev* 2007; 87: 1409-1439.
20. Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars *Science* 2005; 307: 1909-1914.
21. Perez-Tilve D, Nogueiras R, Mallo F, Benoit SC, Tschoep M. Gut hormones ghrelin, PYY, and GLP-1 in the regulation of energy balance [corrected] and metabolism *Endocrine* 2006; 29: 61-71.
22. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans *Diabetes* 2001; 50: 1714-1719.
23. Williams DL, Cummings DE. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states *J Nutr* 2005; 135: 1320-1325.
24. Hameed S, Dhillon WS, Bloom SR. Gut hormones and appetite control *Oral Dis* 2009; 15: 18-26.
25. West DB, Fey D, Woods SC. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats *Am J Physiol* 1984; 246: R776-R787.
26. Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin as adiposity signals *Recent Prog Horm Res* 2004; 59: 267-285.
27. Wang G, Lee HM, Englander E, Greeley GH, Jr. Ghrelin--not just another stomach hormone *Regul Pept* 2002; 105: 75-81.
28. Morton GJ, Blevins JE, Williams DL, Niswender KD, Gelling RW, Rhodes CJ, Baskin DG, Schwartz MW. Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals *J Clin Invest* 2005; 115: 703-710.
29. Moran TH, Ladenheim EE. Adiposity signaling and meal size control *Physiol Behav* 2011; 103: 21-24.
30. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue *Nature* 1994; 372: 425-432.
31. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting *Nature* 1996; 382: 250-252.
32. Tartaglia LA. The leptin receptor *J Biol Chem* 1997; 272: 6093-6096.

33. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans *Nature* 1997; 387: 903-908.
34. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, . Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans *N Engl J Med* 1996; 334: 292-295.
35. Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems *Front Neuroendocrinol* 2000; 21: 263-307.
36. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R *Cell* 1995; 83: 1263-1271.
37. Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, Elmquist JK. Leptin targets in the mouse brain *J Comp Neurol* 2009; 514: 518-532.
38. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus *Nature* 2001; 411: 480-484.
39. Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V, Kenny CD, McGovern RA, Chua SC, Jr., Elmquist JK, Lowell BB. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis *Neuron* 2004; 42: 983-991.
40. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus *J Clin Invest* 1996; 98: 1101-1106.
41. Huo L, Maeng L, Bjorbaek C, Grill HJ. Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin *Endocrinology* 2007; 148: 2189-2197.
42. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans *Nat Med* 1997; 3: 1029-1033.
43. Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation *Biol Reprod* 2002; 66: 1548-1554.
44. Archanco M, Gomez-Ambrosi J, Tena-Sempere M, Fruhbeck G, Burrell MA. Expression of leptin and adiponectin in the rat oviduct *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 1027-1037.

45. Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro J Endocrinol 1999; 161: 211-218.
46. Casabiell X, Pineiro V, Tome MA, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 4270-4273.
47. Casanueva FF, Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin Front Neuroendocrinol 1999; 20: 317-363.
48. Laharrague P, Larrouy D, Fontanilles AM, Truel N, Campfield A, Tenenbaum R, Galitzky J, Corberand JX, Penicaud L, Casteilla L. High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture FASEB J 1998; 12: 747-752.
49. Woods SC, Decke E, Vasselli JR. Metabolic hormones and regulation of body weight Psychol Rev 1974; 81: 26-43.
50. Hillebrand JJ, Geary N. Do leptin and insulin signal adiposity? Forum Nutr 2010; 63: 111-122.
51. Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons Nature 1979; 282: 503-505.
52. D'Alessio DA, Kieffer TJ, Taborsky GJ, Jr., Havel PJ. Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-induced insulin secretion in rhesus macaques J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 1253-1259.
53. Coppack SW, Evans RD, Fisher RM, Frayn KN, Gibbons GF, Humphreys SM, Kirk ML, Potts JL, Hockaday TD. Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal Metabolism 1992; 41: 264-272.
54. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction Science 2000; 289: 2122-2125.
55. Schwartz MW, Bergman RN, Kahn SE, Taborsky GJ, Jr., Fisher LD, Sipols AJ, Woods SC, Steil GM, Porte D, Jr. Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport J Clin Invest 1991; 88: 1272-1281.
56. Woods SC, Porte D, Jr., Bobbioni E, Ionescu E, Sauter JF, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Insulin: its relationship to the central nervous system and to the control of food intake and body weight Am J Clin Nutr 1985; 42: 1063-1071.
57. Carvalheira JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araujo EP, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus Obes Res 2005; 13: 48-57.

58. Koch L, Wunderlich FT, Seibler J, Konner AC, Hampel B, Irlenbusch S, Brabant G, Kahn CR, Schwenk F, Bruning JC. Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice *J Clin Invest* 2008; 118: 2132-2147.
59. Scherer T, O'Hare J, Diggs-Andrews K, Schweiger M, Cheng B, Lindtner C, Zielinski E, Vempati P, Su K, Dighe S, Milsom T, Puchowicz M, Scheja L, Zechner R, Fisher SJ, Previs SF, Buettner C. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis *Cell Metab* 2011; 13: 183-194.
60. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach *Nature* 1999; 402: 656-660.
61. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis *Neuron* 2003; 37: 649-661.
62. Caminos JE, Nogueiras R, Blanco M, Seoane LM, Bravo S, Alvarez CV, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C. Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland *Endocrinology* 2003; 144: 5089-5097.
63. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans *Endocrinology* 2000; 141: 4255-4261.
64. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone *Endocrinology* 2001; 142: 788-794.
65. Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1300-1308.
66. van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin *Endocr Rev* 2004; 25: 426-457.
67. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1630-1635.
68. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity *Diabetes* 2001; 50: 707-709.

69. Nogueiras R, Tovar S, Mitchell SE, Rayner DV, Archer ZA, Dieguez C, Williams LM. Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin *Diabetes* 2004; 53: 2552-2558.
70. Lopez M, Lage R, Saha AK, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodriguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castaneda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschop MH, Dieguez C, Vidal-Puig A. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin *Cell Metab* 2008; 7: 389-399.
71. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents *Nature* 2000; 407: 908-913.
72. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, Castaneda TR, Muzzin P, Schurmann A, Szanto I, Tschop MH, Rohner-Jeanraud F. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism *J Clin Invest* 2006; 116: 1983-1993.
73. Perez-Tilve D, Heppner K, Kirchner H, Lockie SH, Woods SC, Smiley DL, Tschop M, Pfluger P. Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects *FASEB J* 2011.
74. Sangiao-Alvarellos S, Vazquez MJ, Varela L, Nogueiras R, Saha AK, Cordido F, Lopez M, Dieguez C. Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion *Endocrinology* 2009; 150: 4562-4574.
75. Perez-Tilve D, Hofmann SM, Basford J, Nogueiras R, Pfluger PT, Patterson JT, Grant E, Wilson-Perez HE, Granholm NA, Arnold M, Trevaskis JL, Butler AA, Davidson WS, Woods SC, Benoit SC, Sleeman MW, Dimarchi RD, Hui DY, Tschop MH. Melanocortin signaling in the CNS directly regulates circulating cholesterol *Nat Neurosci* 2010; 13: 877-882.
76. Wortley KE, del Rincon JP, Murray JD, Garcia K, Iida K, Thorner MO, Sleeman MW. Absence of ghrelin protects against early-onset obesity *J Clin Invest* 2005; 115: 3573-3578.
77. Pfluger PT, Kirchner H, Gunnell S, Schrott B, Perez-Tilve D, Fu S, Benoit SC, Horvath T, Joost HG, Wortley KE, Sleeman MW, Tschop MH. Simultaneous deletion of ghrelin and its receptor increases motor activity and energy expenditure *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G610-G618.
78. Trayhurn P, Bing C. Appetite and energy balance signals from adipocytes *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1237-1249.
79. Moreno MJ, Martinez JA. [Adipose tissue: a storage and secretory organ] *An Sist Sanit Navar* 2002; 25 Suppl 1: 29-39.
80. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332.

81. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 219-246.
82. Cannon JG. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States *News Physiol Sci* 2000; 15: 298-303.
83. Orsi NM, Gopichandran N, Ekbote UV, Walker JJ. Murine serum cytokines throughout the estrous cycle, pregnancy and post partum period *Anim Reprod Sci* 2006; 96: 54-65.
84. Fain JN, Buehrer B, Tichansky DS, Madan AK. Regulation of adiponectin release and demonstration of adiponectin mRNA as well as release by the non-fat cells of human omental adipose tissue *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 429-435.
85. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1595-1599.
86. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation *J Lipid Res* 2005; 46: 1369-1379.
87. Park S, Kim DS, Kwon DY, Yang HJ. Long-term central infusion of adiponectin improves energy and glucose homeostasis by decreasing fat storage and suppressing hepatic gluconeogenesis without changing food intake *J Neuroendocrinol* 2011.
88. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight *Nat Med* 2004; 10: 524-529.
89. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action *Nat Med* 2001; 7: 947-953.
90. Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells *Diabetologia* 2005; 48: 132-139.
91. Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brichard SM. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 1102-1107.
92. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30 *Nat Med* 2002; 8: 731-737.

93. 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.
94. 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.
95. Morash BA, Willkinson D, Ur E, Wilkinson M. Resistin expression and regulation in mouse pituitary *FEBS Lett* 2002; 526: 26-30.
96. Viengchareun S, Zennaro MC, Pascual-Le TL, Lombes M. Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin *FEBS Lett* 2002; 532: 345-350.
97. Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C. Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner *FEBS Lett* 2003; 548: 21-27.
98. Nogueiras R, Barreiro ML, Caminos JE, Gaytan F, Suominen JS, Navarro VM, Casanueva FF, Aguilar E, Toppari J, Dieguez C, Tena-Sempere M. Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors *J Cell Sci* 2004; 117: 3247-3257.
99. Lazar MA. Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases *Horm Metab Res* 2007; 39: 710-716.
100. Qatanani M, Szwegold NR, Greaves DR, Ahima RS, Lazar MA. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice *J Clin Invest* 2009; 119: 531-539.
101. Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, Castaneda TR, Vazquez MJ, Morris A, Williams LM, Dickson SL, Dieguez C. Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats *Eur J Endocrinol* 2005; 153: R1-R5.
102. Vazquez MJ, Gonzalez CR, Varela L, Lage R, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, Williams LM, Vidal-Puig A, Nogueiras R, Lopez M, Dieguez C. Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion *Endocrinology* 2008; 149: 4534-4543.
103. Singhal NS, Lazar MA, Ahima RS. Central resistin induces hepatic insulin resistance via neuropeptide Y *J Neurosci* 2007; 27: 12924-12932.
104. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance *Science* 1993; 259: 87-91.
105. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- α and adipocyte biology *FEBS Lett* 2008; 582: 117-131.

106. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-2415.
107. Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, Moraes JC, Bonfleur ML, Degasperi GR, Picardi PK, Hirabara S, Boschero AC, Curi R, Velloso LA. Deletion of tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis *J Biol Chem* 2009; 284: 36213-36222.
108. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 447-455.
109. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction *J Biol Chem* 1997; 272: 971-976.
110. Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerami A, Ringold GM. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia *Science* 1985; 229: 867-869.
111. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders *Nature* 2006; 444: 860-867.
112. Wilding JP. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes *Diabet Med* 2007; 24: 934-945.
113. Thaler JP, Choi SJ, Schwartz MW, Wisse BE. Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: resolving the paradox *Front Neuroendocrinol* 2010; 31: 79-84.
114. Cartmell T, Southgate T, Rees GS, Castro MG, Lowenstein PR, Luheshi GN. Interleukin-1 mediates a rapid inflammatory response after injection of adenoviral vectors into the brain *J Neurosci* 1999; 19: 1517-1523.
115. Luheshi GN, Gardner JD, Rushforth DA, Loudon AS, Rothwell NJ. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1 *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7047-7052.
116. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist *Int Rev Immunol* 1998; 16: 457-499.
117. Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, Rohner-Jeanrenaud F, Burger D, Dayer JM, Meier CA. Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation *Diabetes* 2003; 52: 1104-1110.
118. Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimacopoulos-Jeannet F, Golay A, Dayer JM. IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1184-1188.

119. Wisse BE, Ogimoto K, Morton GJ, Wilkinson CW, Frayo RS, Cummings DE, Schwartz MW. Physiological regulation of hypothalamic IL-1beta gene expression by leptin and glucocorticoids: implications for energy homeostasis *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E1107-E1113.
120. Garcia MC, Wernstedt I, Berndtsson A, Enge M, Bell M, Hultgren O, Horn M, Ahren B, Enerback S, Ohlsson C, Wallenius V, Jansson JO. Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice *Diabetes* 2006; 55: 1205-1213.
121. Wisse BE, Ogimoto K, Morton GJ, Williams DL, Schwartz MW. Central interleukin-1 (IL1) signaling is required for pharmacological, but not physiological, effects of leptin on energy balance *Brain Res* 2007; 1144: 101-106.
122. Matsuki T, Horai R, Sudo K, Iwakura Y. IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions *J Exp Med* 2003; 198: 877-888.
123. Simons PJ, van den Pangaart PS, van Roomen CP, Aerts JM, Boon L. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-treated human preadipocytes are potent leptin producers *Cytokine* 2005; 32: 94-103.
124. del RA, Monge-Arditi G, Klusman I, Besedovsky HO. Metabolic and endocrine effects of interleukin-1 in obese, diabetic Zucker fa/fa rats *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: 317-326.
125. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehres J, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath M. [Interleukin-1 receptor antagonist-treatment of patients with type 2 diabetes] *Ugeskr Laeger* 2007; 169: 3868-3871.
126. McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, Oliver E, Claessens M, Mills KH, Roche HM. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis *Diabetes* 2011; 60: 1688-1698.
127. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation *Biochem J* 2003; 374: 1-20.
128. Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH, Kishimoto T. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2) *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 5490-5494.
129. Content J, De WL, Poupart P, Opdenakker G, Van DJ, Billiau A. Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor *Eur J Biochem* 1985; 152: 253-257.
130. Astaldi GC, Janssen MC, Lansdorp P, Willems C, Zeijlemaker WP, Oosterhof F. Human endothelial culture supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas *J Immunol* 1980; 125: 1411-1414.

131. Hirano T, Taga T, Yamasaki K, Matsuda T, Yasukawa K, Hirata Y, Yawata H, Tanabe O, Akira S, Kishimoto T. Molecular cloning of the cDNAs for interleukin-6/B cell stimulatory factor 2 and its receptor *Ann N Y Acad Sci* 1989; 557: 167-78, discussion.
132. Fuller GM, Bunzel RJ, Woloski BM, Nham SU. Isolation of hepatocyte stimulating factor from human monocytes *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 144: 1003-1009.
133. Choy E. Clinical experience with inhibition of interleukin-6 *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30: 405-15, viii.
134. Kubaszek A, Pihlajamaki J, Punnonen K, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso M. The C-174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity *Diabetes* 2003; 52: 558-561.
135. Santhanam U, Ray A, Sehgal PB. Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7605-7609.
136. Vicennati V, Vottero A, Friedman C, Papanicolaou DA. Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 905-911.
137. Mohamed-Ali V, Flower L, Sethi J, Hotamisligil G, Gray R, Humphries SE, York DA, Pinkney J. beta-Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5864-5869.
138. Breuninger LM, Dempsey WL, Uhl J, Murasko DM. Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein production by a purified population of human peripheral blood monocytes *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69: 205-214.
139. Ray A, Prefontaine KE, Ray P. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor *J Biol Chem* 1994; 269: 12940-12946.
140. Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease *FASEB J* 2001; 15: 43-58.
141. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer *J Leukoc Biol* 2006; 80: 227-236.
142. Febbraio MA. gp130 receptor ligands as potential therapeutic targets for obesity *J Clin Invest* 2007; 117: 841-849.
143. Memoli B, Procino A, Calabro P, Esposito P, Grandaliano G, Pertosa G, Prete MD, Andreucci M, Lillo SD, Ferulano G, Cillo C, Savastano S, Colao A, Guida B. Inflammation may modulate IL-6 and C-reactive protein gene expression in the adipose tissue: the role of IL-6 cell membrane receptor *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E1030-E1035.

144. Akerstrom TC, Krogh-Madsen R, Petersen AM, Pedersen BK. Glucose ingestion during endurance training in men attenuates expression of myokine receptor *Exp Physiol* 2009; 94: 1124-1131.
145. Bethin KE, Vogt SK, Muglia LJ. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9317-9322.
146. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function *Biochem J* 1994; 300 (Pt 2): 281-290.
147. Zhang JG, Zhang Y, Owczarek CM, Ward LD, Moritz RL, Simpson RJ, Yasukawa K, Nicola NA. Identification and characterization of two distinct truncated forms of gp130 and a soluble form of leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain in normal human urine and plasma *J Biol Chem* 1998; 273: 10798-10805.
148. Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase *Science* 1993; 260: 1808-1810.
149. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration *J Immunol* 2007; 178: 2623-2629.
150. Xu Y, Hill JW, Fukuda M, Gautron L, Sohn JW, Kim KW, Lee CE, Choi MJ, Lauzon DA, Dhillon H, Lowell BB, Zigman JM, Zhao JJ, Elmquist JK. PI3K signaling in the ventromedial hypothalamic nucleus is required for normal energy homeostasis *Cell Metab* 2010; 12: 88-95.
151. Cong L, Chen K, Li J, Gao P, Li Q, Mi S, Wu X, Zhao AZ. Regulation of adiponectin and leptin secretion and expression by insulin through a PI3K-PDE3B dependent mechanism in rat primary adipocytes *Biochem J* 2007; 403: 519-525.
152. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4196-4200.
153. Goyenechea E, Parra MD, Martinez Hernandez JA. [Role of IL-6 and its -174G>C polymorphism in weight management and in the metabolic comorbidities associated with obesity] *An Sist Sanit Navar* 2005; 28: 357-366.
154. Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse *Diabetes Metab* 2004; 30: 13-19.
155. Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, Pedersen BK. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles *J Physiol* 2000; 528 Pt 1: 157-163.
156. Schobitz B, de Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain *Eur J Neurosci* 1993; 5: 1426-1435.

157. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity *Nat Med* 2002; 8: 75-79.
158. Wallenius K, Wallenius V, Sunter D, Dickson SL, Jansson JO. Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 560-565.
159. Stenlof K, Wernstedt I, Fjallman T, Wallenius V, Wallenius K, Jansson JO. Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4379-4383.
160. Steensberg A, Dalgaard MK, Secher NH, Pedersen BK. Cerebrospinal fluid IL-6, HSP72, and TNF-alpha in exercising humans *Brain Behav Immun* 2006; 20: 585-589.
161. Andersson N, Strandberg L, Nilsson S, Adamovic S, Karlsson MK, Ljunggren O, Mellstrom D, Lane NE, Zmuda JM, Nielsen C, Orwoll E, Lorentzon M, Ohlsson C, Jansson JO. A variant near the interleukin-6 gene is associated with fat mass in Caucasian men *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 1011-1019.
162. Strandberg L, Mellstrom D, Ljunggren O, Grundberg E, Karlsson MK, Holmberg AH, Orwoll ES, Eriksson AL, Svedberg J, Bengtsson M, Ohlsson C, Jansson JO. IL6 and IL1B polymorphisms are associated with fat mass in older men: the MrOS Study Sweden Obesity (Silver Spring) 2008; 16: 710-713.
163. Corpeleijn E, Petersen L, Holst C, Saris WH, Astrup A, Langin D, MacDonald I, Martinez JA, Oppert JM, Polak J, Pedersen O, Froguel P, Arner P, Sorensen TI, Blaak EE. Obesity-related polymorphisms and their associations with the ability to regulate fat oxidation in obese Europeans: the NUGENOB study *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18: 1369-1377.
164. Yu Z, Han S, Cao X, Zhu C, Wang X, Guo X. Genetic Polymorphisms in Adipokine Genes and the Risk of Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis *Obesity (Silver Spring)* 2011.
165. Qi L, Zhang C, van Dam RM, Hu FB. Interleukin-6 genetic variability and adiposity: associations in two prospective cohorts and systematic review in 26,944 individuals *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3618-3625.
166. Huth C, Illig T, Herder C, Gieger C, Grallert H, Vollmert C, Rathmann W, Hamid YH, Pedersen O, Hansen T, Thorand B, Meisinger C, Doring A, Klopp N, Gohlke H, Lieb W, Hengstenberg C, Lyssenko V, Groop L, Ireland H, Stephens JW, Wernstedt A, I, Jansson JO, Boeing H, Mohlig M, Stringham HM, Boehnke M, Tuomilehto J, Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Gallart L, Vendrell J, Humphries SE, Kronenberg F, Wichmann HE, Heid IM. Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the IL6 variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index *Ann Med* 2009; 41: 128-138.

167. Berthier MT, Paradis AM, Tchernof A, Bergeron J, Prud'homme D, Despres JP, Vohl MC. The interleukin 6-174G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men *J Hum Genet* 2003; 48: 14-19.
168. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation *J Biol Chem* 2000; 275: 18138-18144.
169. Hidalgo J, Florit S, Giralt M, Ferrer B, Keller C, Pilegaard H. Transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-6 are resistant to high-fat diet-induced increases in body weight and body fat *Brain Behav Immun* 2010; 24: 119-126.
170. Li G, Klein RL, Matheny M, King MA, Meyer EM, Scarpace PJ. 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* 2002; 115: 879-889.
171. Chida D, Osaka T, Hashimoto O, Iwakura Y. Combined interleukin-6 and interleukin-1 deficiency causes obesity in young mice *Diabetes* 2006; 55: 971-977.
172. Flores MB, Fernandes MF, Ropelle ER, Faria MC, Ueno M, Velloso LA, Saad MJ, Carnevalheira JB. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats *Diabetes* 2006; 55: 2554-2561.
173. Borges BC, Rorato R, Avraham Y, da Silva LE, Castro M, Vorobiac L, Berry E, Antunes-Rodrigues J, Elias LL. Leptin resistance and desensitization of hypophagia during prolonged inflammatory challenge *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300: E858-E869.
174. Wernstedt I, Edgley A, Berndtsson A, Faldt J, Bergstrom G, Wallenius V, Jansson JO. Reduced stress- and cold-induced increase in energy expenditure in interleukin-6-deficient mice *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291: R551-R557.
175. Benrick A, Schele E, Pinnock SB, Wernstedt-Asterholm I, Dickson SL, Karlsson-Lindahl L, Jansson JO. Interleukin-6 gene knockout influences energy balance regulating peptides in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 620-628.
176. Sopasakis VR, Sandqvist M, Gustafson B, Hammarstedt A, Schmelz M, Yang X, Jansson PA, Smith U. High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator *Obes Res* 2004; 12: 454-460.
177. Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M, Steinberg GR, Macaulay SL, Febbraio MA, Pedersen BK. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E155-E162.
178. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. 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* 1992; 52: 4113-4116.

179. Watt MJ, Carey AL, Wolsk-Petersen E, Kraemer FB, Pedersen BK, Febbraio MA. Hormone-sensitive lipase is reduced in the adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus: influence of IL-6 infusion *Diabetologia* 2005; 48: 105-112.
180. van HG, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Moller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3005-3010.
181. Wernstedt I, Olsson B, Jernas M, Paglialunga S, Carlsson LM, Smith U, Cianflone K, Wallenius K, Wallenius V. Increased levels of acylation-stimulating protein in interleukin-6-deficient (IL-6(-/-)) mice *Endocrinology* 2006; 147: 2690-2695.
182. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5577-5582.
183. Lyngso D, Simonsen L, Bulow J. Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue *J Physiol* 2002; 543: 379-386.
184. Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Ritov VB, Menshikova EV, Kelley DE, Hidalgo J, Pedersen BK, Kelly M. Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome *Diabetes* 2006; 55 Suppl 2: S48-S54.
185. Kelly M, Keller C, Avilucea PR, Keller P, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Hidalgo J, Saha AK, Pedersen BK, Ruderman NB. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 449-454.
186. Peters M, Schirmacher P, Goldschmitt J, Odenthal M, Peschel C, Fattori E, Ciliberto G, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH, Rose-John S. Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice *J Exp Med* 1997; 185: 755-766.
187. Rotter S, V, Larsson BM, Johansson A, Holmang A, Smith U. Short-term infusion of interleukin-6 does not induce insulin resistance in vivo or impair insulin signalling in rats *Diabetologia* 2004; 47: 1879-1887.
188. Stouthard JM, Oude Elferink RP, Sauerwein HP. Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 241-245.
189. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion *Obes Res* 2001; 9: 414-417.

190. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes *Diabetes* 2002; 51: 3391-3399.
191. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects *J Biol Chem* 2003; 278: 45777-45784.
192. Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice *Diabetes* 2003; 52: 2784-2789.
193. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes *J Biol Chem* 2003; 278: 13740-13746.
194. Wunderlich FT, Strohle P, Konner AC, Gruber S, Tovar S, Bronneke HS, Juntti-Berggren L, Li LS, van RN, Libert C, Berggren PO, Bruning JC. Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action *Cell Metab* 2010; 12: 237-249.
195. Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MH, Henstridge DC, Watson N, Zaffino LA, Babb JR, Boon J, Meikle PJ, Jowett JB, Watt MJ, Jansson JO, Bruce CR, Febbraio MA. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance *Diabetologia* 2010; 53: 2431-2441.
196. Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects *J Physiol* 2001; 536: 329-337.
197. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 2006; 12: 6-33.
198. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise *J Appl Physiol* 2005; 98: 1154-1162.
199. Ullum H, Haahr PM, Diamant M, Palmo J, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC *J Appl Physiol* 1994; 77: 93-97.
200. Keller C, Steensberg A, Hansen AK, Fischer CP, Plomgaard P, Pedersen BK. Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle *J Appl Physiol* 2005; 99: 2075-2079.
201. Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction *Diabetes* 2004; 53: 1643-1648.
202. Pedersen BK, Febbraio M. Muscle-derived interleukin-6--a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain *Brain Behav Immun* 2005; 19: 371-376.

203. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, Prelovsek O, Hohnen-Behrens C, Watt MJ, James DE, Kemp BE, Pedersen BK, Febbraio MA. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase *Diabetes* 2006; 55: 2688-2697.
204. Al-Khalili L, Bouzakri K, Glund S, Lonnqvist F, Koistinen HA, Krook A. Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle *Mol Endocrinol* 2006; 20: 3364-3375.
205. Faldt J, Wernstedt I, Fitzgerald SM, Wallenius K, Bergstrom G, Jansson JO. Reduced exercise endurance in interleukin-6-deficient mice *Endocrinology* 2004; 145: 2680-2686.
206. Horvath TL, Diano S, Tschop M. Brain circuits regulating energy homeostasis *Neuroscientist* 2004; 10: 235-246.
207. Gao Q, Horvath TL. Neuronal control of energy homeostasis *FEBS Lett* 2008; 582: 132-141.
208. Shin AC, Zheng H, Berthoud HR. An expanded view of energy homeostasis: neural integration of metabolic, cognitive, and emotional drives to eat *Physiol Behav* 2009; 97: 572-580.
209. Berthoud HR, Shin AC, Zheng H. Obesity surgery and gut-brain communication *Physiol Behav* 2011.
210. Vianna CR, Coppari R. A treasure trove of hypothalamic neurocircuitries governing body weight homeostasis *Endocrinology* 2011; 152: 11-18.
211. Brightman MW, Broadwell RD. The morphological approach to the study of normal and abnormal brain permeability *Adv Exp Med Biol* 1976; 69: 41-54.
212. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight *Nature* 2006; 443: 289-295.
213. Garfield AS, Lam DD, Marston OJ, Przydzial MJ, Heisler LK. Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 203-215.
214. Morris BJ. Neuronal localisation of neuropeptide Y gene expression in rat brain *J Comp Neurol* 1989; 290: 358-368.
215. Swart I, Jahng JW, Overton JM, Houpt TA. Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R1020-R1026.
216. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity *Endocrinology* 1993; 133: 1753-1758.

217. Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism *Am J Physiol* 1991; 260: R321-R327.
218. Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y *Nature* 1996; 381: 415-421.
219. Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y *Science* 1996; 274: 1704-1707.
220. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates *Science* 2005; 310: 683-685.
221. Larhammar D. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide *Regul Pept* 1996; 65: 165-174.
222. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake *Physiol Rev* 2005; 85: 1131-1158.
223. Butler AA. The melanocortin system and energy balance *Peptides* 2006; 27: 281-290.
224. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans *Nat Genet* 1998; 19: 155-157.
225. Pritchard LE, White A. Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways *Endocrinology* 2007; 148: 4201-4207.
226. Breit A, Buch TR, Boekhoff I, Solinski HJ, Damm E, Gudermann T. Alternative G protein coupling and biased agonism: new insights into melanocortin-4 receptor signalling *Mol Cell Endocrinol* 2011; 331: 232-240.
227. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice *Cell* 1997; 88: 131-141.
228. Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency *J Clin Invest* 2000; 106: 271-279.
229. Butler AA, Cone RD. The melanocortin receptors: lessons from knockout models *Neuropeptides* 2002; 36: 77-84.
230. Marks DL, Hruby V, Brookhart G, Cone RD. The regulation of food intake by selective stimulation of the type 3 melanocortin receptor (MC3R) *Peptides* 2006; 27: 259-264.
231. Abbott CR, Rossi M, Kim M, AlAhmed SH, Taylor GM, Ghatei MA, Smith DM, Bloom SR. Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake.

- Lack Of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor *Brain Res* 2000; 869: 203-210.
232. Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass *Nat Genet* 2000; 26: 97-102.
 233. Pierroz DD, Ziotopoulou M, Ungsuan L, Moschos S, Flier JS, Mantzoros CS. Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity *Diabetes* 2002; 51: 1337-1345.
 234. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system *Nat Neurosci* 2005; 8: 571-578.
 235. Toda C, Shiuchi T, Lee S, Yamato-Esaki M, Fujino Y, Suzuki A, Okamoto S, Minokoshi Y. Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues *Diabetes* 2009; 58: 2757-2765.
 236. Klebig ML, Wilkinson JE, Geisler JG, Woychik RP. Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4728-4732.
 237. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons *Nat Neurosci* 1998; 1: 271-272.
 238. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein *Science* 1997; 278: 135-138.
 239. Qian S, Chen H, Weingarh D, Trumbauer ME, Novi DE, Guan X, Yu H, Shen Z, Feng Y, Frazier E, Chen A, Camacho RE, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Marsh DJ. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5027-5035.
 240. Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation *Cell* 2009; 137: 1225-1234.
 241. Phillips CT, Palmiter RD. Role of agouti-related protein-expressing neurons in lactation *Endocrinology* 2008; 149: 544-550.
 242. Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance *Nat Neurosci* 2008; 11: 998-1000.
 243. Berthoud HR, Munzberg H. The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics *Physiol Behav* 2011; 104: 29-39.

244. Lopez M, Tovar S, Vazquez MJ, Williams LM, Dieguez C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake *Proc Nutr Soc* 2007; 66: 131-155.
245. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26: 393-428.
246. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice *Neuron* 2003; 38: 701-713.
247. Espana RA, McCormack SL, Mochizuki T, Scammell TE. Running promotes wakefulness and increases cataplexy in orexin knockout mice *Sleep* 2007; 30: 1417-1425.
248. Funato H, Tsai AL, Willie JT, Kisanuki Y, Williams SC, Sakurai T, Yanagisawa M. Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity *Cell Metab* 2009; 9: 64-76.
249. Madden CJ, Morrison SF. Neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit sympathetic outflow to brown adipose tissue *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: R831-R843.
250. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake *Physiol Rev* 2005; 85: 1131-1158.
251. Benrick A, Schele E, Pinnock SB, Wernstedt-Asterholm I, Dickson SL, Karlsson-Lindahl L, Jansson JO. Interleukin-6 gene knockout influences energy balance regulating peptides in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 620-628.
252. Senaris RM, Trujillo ML, Navia B, Comes G, Ferrer B, Giralt M, Hidalgo J. Interleukin-6 regulates the expression of hypothalamic neuropeptides involved in body weight in a gender-dependent way *J Neuroendocrinol* 2011; 23: 675-686.
253. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin *Science* 1981; 213: 1394-1397.
254. Harris RB. Leptin responsiveness of mice deficient in corticotrophin-releasing hormone receptor type 2 *Neuroendocrinology* 2010; 92: 198-206.
255. Masaki T, Yoshimichi G, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice *Endocrinology* 2003; 144: 3547-3554.
256. Lechan RM, Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism *Prog Brain Res* 2006; 153: 209-235.

257. Nillni EA. Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs *Front Neuroendocrinol* 2010; 31: 134-156.
258. Wittmann G, Fuzesi T, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. Distribution and axonal projections of neurons coexpressing thyrotropin-releasing hormone and urocortin 3 in the rat brain *J Comp Neurol* 2009; 517: 825-840.
259. Shintani M, Tamura Y, Monden M, Shiomi H. Thyrotropin-releasing hormone induced thermogenesis in Syrian hamsters: site of action and receptor subtype *Brain Res* 2005; 1039: 22-29.
260. Rogers RC, Barnes MJ, Hermann GE. Leptin "gates" thermogenic action of thyrotropin-releasing hormone in the hindbrain *Brain Res* 2009; 1295: 135-141.
261. Chen P, Williams SM, Grove KL, Smith MS. Melanocortin 4 receptor-mediated hyperphagia and activation of neuropeptide Y expression in the dorsomedial hypothalamus during lactation *J Neurosci* 2004; 24: 5091-5100.
262. Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ. Central control of thermogenesis in mammals *Exp Physiol* 2008; 93: 773-797.
263. Chao PT, Yang L, Aja S, Moran TH, Bi S. Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity *Cell Metab* 2011; 13: 573-583.
264. King BM. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight *Physiol Behav* 2006; 87: 221-244.
265. Ruffin M, Nicolaidis S. Electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus enhances both fat utilization and metabolic rate that precede and parallel the inhibition of feeding behavior *Brain Res* 1999; 846: 23-29.
266. Bannai M, Ichikawa M, Nishihara M, Takahashi M. Effect of injection of antisense oligodeoxynucleotides of GAD isozymes into rat ventromedial hypothalamus on food intake and locomotor activity *Brain Res* 1998; 784: 305-315.
267. Tran PV, Lee MB, Marin O, Xu B, Jones KR, Reichardt LF, Rubenstein JR, Ingraham HA. Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons *Mol Cell Neurosci* 2003; 22: 441-453.
268. Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M. Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity *J Neurosci* 2007; 27: 14265-14274.
269. Lopez M, Varela L, Vazquez MJ, Rodriguez-Cuenca S, Gonzalez CR, Velagapudi VR, Morgan DA, Schoenmakers E, Agassandian K, Lage R, Martinez de Morentin PB, Tovar S, Nogueiras R, Carling D, Lelliott C, Gallego R, Oresic M, Chatterjee K, Saha AK, Rahmouni K, Dieguez C, Vidal-Puig A. Hypothalamic

- AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance
Nat Med 2010; 16: 1001-1008.
270. Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes
Physiol Behav 2001; 74: 683-701.
 271. Lopez M, Tovar S, Vazquez MJ, Nogueiras R, Senaris R, Dieguez C. Sensing the fat: fatty acid metabolism in the hypothalamus and the melanocortin system
Peptides 2005; 26: 1753-1758.
 272. Morgan K, Obici S, Rossetti L. Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated
J Biol Chem 2004; 279: 31139-31148.
 273. Nogueiras R, Lopez M, Dieguez C. Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system
Obes Rev 2010; 11: 185-201.
 274. Hu Z, Cha SH, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior
Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 12624-12629.
 275. Lopez M, Lelliott CJ, Tovar S, Kimber W, Gallego R, Virtue S, Blount M, Vazquez MJ, Finer N, Powles TJ, O'Rahilly S, Saha AK, Dieguez C, Vidal-Puig AJ. Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA
Diabetes 2006; 55: 1327-1336.
 276. Lage R, Dieguez C, Vidal-Puig A, Lopez M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis
Trends Mol Med 2008; 14: 539-549.
 277. Kreier F, Buijs RM. Evidence for parasympathetic innervation of white adipose tissue, clearing up some vagaries
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007; 293: R548-R549.
 278. Astrup A, Macdonald IA. Sympathoadrenal System and Metabolism. In: *Handbook of Obesity*. Marcel Dekker, ed. 1998: 491-512.
 279. Kobilka BK. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology
Trends Pharmacol Sci 2011; 32: 213-218.
 280. Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function
J Lipid Res 1993; 34: 1057-1091.
 281. Daly CJ, McGrath JC. Previously unsuspected widespread cellular and tissue distribution of beta-adrenoceptors and its relevance to drug action
Trends Pharmacol Sci 2011; 32: 219-226.
 282. Robert H Lustig. The efferent arm of the energy balance regulatory pathways. *Energy Metabolism and Obesity Research and Clinical Applications*. In: 2008: 69-85.
 283. Davy KP, Orr JS. Sympathetic nervous system behavior in human obesity
Neurosci Biobehav Rev 2009; 33: 116-124.

284. Morrison SF. Differential control of sympathetic outflow *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R683-R698.
285. Snitker S, MacDonald I, Ravussin E, Astrup A. The sympathetic nervous system and obesity: role in aetiology and treatment *Obes Rev* 2000; 1: 5-15.
286. Obregón M.J. Obesidad, termogénesis y hormonas tiroideas *Rev Esp Obes* 2007; 27-38.
287. Ravussin E, Lillioja S, Anderson TE, Christin L, Bogardus C. Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber *J Clin Invest* 1986; 78: 1568-1578.
288. Do R, Bailey SD, Desbiens K, Belisle A, Montpetit A, Bouchard C, Perusse L, Vohl MC, Engert JC. Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study *Diabetes* 2008; 57: 1147-1150.
289. Krakoff J, Ma L, Kobes S, Knowler WC, Hanson RL, Bogardus C, Baier LJ. Lower metabolic rate in individuals heterozygous for either a frameshift or a functional missense MC4R variant *Diabetes* 2008; 57: 3267-3272.
290. Ravussin E, Macdonald IA. Sympathoadrenal System and Metabolism. In: *Handbook of Obesity*. Marcel Dekker, ed. 2004: 693-704.
291. Saad MF, Alger SA, Zurlo F, Young JB, Bogardus C, Ravussin E. Ethnic differences in sympathetic nervous system-mediated energy expenditure *Am J Physiol* 1991; 261: E789-E794.
292. Castaneda TR, Jurgens H, Wiedmer P, Pfluger P, Diano S, Horvath TL, Tang-Christensen M, Tschop MH. Obesity and the neuroendocrine control of energy homeostasis: the role of spontaneous locomotor activity *J Nutr* 2005; 135: 1314-1319.
293. Garland T, Jr., Schutz H, Chappell MA, Keeney BK, Meek TH, Copes LE, Acosta W, Drenowatz C, Maciel RC, van DG, Kotz CM, Eisenmann JC. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives *J Exp Biol* 2011; 214: 206-229.
294. Kotz CM. Integration of feeding and spontaneous physical activity: role for orexin *Physiol Behav* 2006; 88: 294-301.
295. Kotz CM, Teske JA, Billington CJ. Neuroregulation of nonexercise activity thermogenesis and obesity resistance *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: R699-R710.
296. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity *Neuron* 2001; 30: 345-354.

297. Klingenspor M. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis *Exp Physiol* 2003; 88: 141-148.
298. Champigny O, Ricquier D. Effects of fasting and refeeding on the level of uncoupling protein mRNA in rat brown adipose tissue: evidence for diet-induced and cold-induced responses *J Nutr* 1990; 120: 1730-1736.
299. Lowell BB, Bachman ES. Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity *J Biol Chem* 2003; 278: 29385-29388.
300. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E827-E847.
301. Cinti S. The adipose organ Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2005; 73: 9-15.
302. Coppack SW, Jensen MD, Miles JM. In vivo regulation of lipolysis in humans *J Lipid Res* 1994; 35: 177-193.
303. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance *Cell* 2001; 104: 531-543.
304. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance *Physiol Rev* 2004; 84: 277-359.
305. Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ *Cell Metab* 2010; 11: 253-256.
306. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults *N Engl J Med* 2009; 360: 1518-1525.
307. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men *N Engl J Med* 2009; 360: 1500-1508.
308. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity *J Clin Invest* 1998; 102: 412-420.
309. Madsen L, Pedersen LM, Lillefosse HH, Fjaere E, Bronstad I, Hao Q, Petersen RK, Hallenborg P, Ma T, De MR, Araujo P, Mercader J, Bonet ML, Hansen JB, Cannon B, Nedergaard J, Wang J, Cinti S, Voshol P, Doskeland SO, Kristiansen K. UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity *PLoS One* 2010; 5: e11391.
310. Koppen A, Kalkhoven E. Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story *FEBS Lett* 2010; 584: 3250-3259.
311. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the Adipose Organ *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009.

312. Watson PM, Commins SP, Beiler RJ, Hatcher HC, Gettys TW. Differential regulation of leptin expression and function in A/J vs. C57BL/6J mice during diet-induced obesity *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E356-E365.
313. BALL EG, JUNGAS RL. On the action of hormones which accelerate the rate of oxygen consumption and fatty acid release in rat adipose tissue in vitro *Proc Natl Acad Sci U S A* 1961; 47: 932-941.
314. Ricquier D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 47-52.
315. Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DF, Porter RK. The causes and functions of mitochondrial proton leak *Biochim Biophys Acta* 1994; 1187: 132-139.
316. Parker N, Vidal-Puig A, Brand MD. Stimulation of mitochondrial proton conductance by hydroxynonenal requires a high membrane potential *Biosci Rep* 2008; 28: 83-88.
317. Argyropoulos G, Harper ME. Uncoupling proteins and thermoregulation *J Appl Physiol* 2002; 92: 2187-2198.
318. Garlid KD, Jaburek M, Jezek P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins *FEBS Lett* 1998; 438: 10-14.
319. Winkler E, Klingenberg M. Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein *J Biol Chem* 1994; 269: 2508-2515.
320. Collins S, Cao W, Daniel KW, Dixon TM, Medvedev AV, Onuma H, Surwit R. Adrenoceptors, uncoupling proteins, and energy expenditure *Exp Biol Med* (Maywood) 2001; 226: 982-990.
321. Stock MJ, Rothwell NJ. The role of brown fat in diet-induced thermogenesis *Int J Vitam Nutr Res* 1986; 56: 205-210.
322. Schwartz JH, Young JB, Landsberg L. Effect of dietary fat on sympathetic nervous system activity in the rat *J Clin Invest* 1983; 72: 361-370.
323. Villarroya F, Felipe A, Mampel T. Brown adipose tissue activity in hypocaloric-diet fed lactating rats *Biosci Rep* 1986; 6: 669-675.
324. Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese *Nature* 1997; 387: 90-94.
325. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality *Cell Metab* 2009; 9: 203-209.
326. Watanabe M, Yamamoto T, Mori C, Okada N, Yamazaki N, Kajimoto K, Kataoka M, Shinohara Y. Cold-induced changes in gene expression in brown adipose

- tissue: implications for the activation of thermogenesis *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 775-784.
327. Cassard-Doulcier AM, Gelly C, Fox N, Schrementi J, Raimbault S, Klaus S, Forest C, Bouillaud F, Ricquier D. Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'-flanking region *Mol Endocrinol* 1993; 7: 497-506.
328. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action *Physiol Rev* 2001; 81: 1097-1142.
329. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis *Cell* 1998; 92: 829-839.
330. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 1269-1278.
331. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor *Diabetes* 1998; 47: 507-514.
332. Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18 Suppl 2: S10-S15.
333. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding *Endocrinology* 2001; 142: 4195-4202.
334. Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgammacoactivator-1 (PGC1) *Public Health Nutr* 2007; 10: 1132-1137.
335. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development *Mol Cell* 1999; 4: 585-595.
336. Gray SL, Dalla NE, Vidal-Puig AJ. Mouse models of PPAR-gamma deficiency: dissecting PPAR-gamma's role in metabolic homeostasis *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 1053-1058.
337. Shao D, Lazar MA. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation *J Biol Chem* 1997; 272: 21473-21478.
338. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells *Genes Dev* 1991; 5: 1538-1552.
339. Lin FT, Lane MD. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8757-8761.

340. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation *J Lipid Res* 2007; 48: 1253-1262.
341. Wu Z, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis *Genes Dev* 1995; 9: 2350-2363.
342. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 345-373.
343. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 145-171.
344. Tiraby C, Langin D. Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 439-441.
345. Lin JD. Minireview: the PGC-1 coactivator networks: chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism *Mol Endocrinol* 2009; 23: 2-10.
346. Nicholls D, Cunningham S, Wiesinger H. Mechanisms of thermogenesis in brown adipose tissue *Biochem Soc Trans* 1986; 14: 223-225.
347. Villena JA, Carmona MC, Rodriguez dIC, Rossmeisl M, Vinas O, Mampel T, Iglesias R, Giral M, Villarroya F. Mitochondrial biogenesis in brown adipose tissue is associated with differential expression of transcription regulatory factors *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1934-1944.
348. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function *Physiol Rev* 2008; 88: 611-638.
349. Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA. Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 127-134.
350. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 *Cell* 1999; 98: 115-124.
351. Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader JA, Richard D, Giguere V. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7947-7956.
352. Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men *Genes Dev* 2009; 23: 788-797.
353. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, Willy PJ, Schulman IG, Heyman RA, Lander ES, Spiegelman BM. Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-

- dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 6570-6575.
354. Kozak UC, Kopecky J, Teisinger J, Enerback S, Boyer B, Kozak LP. An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene *Mol Cell Biol* 1994; 14: 59-67.
 355. Lelliott CJ, Medina-Gomez G, Petrovic N, Kis A, Feldmann HM, Bjursell M, Parker N, Curtis K, Campbell M, Hu P, Zhang D, Litwin SE, Zaha VG, Fountain KT, Boudina S, Jimenez-Linan M, Blount M, Lopez M, Meirhaeghe A, Bohlooly Y, Storlien L, Stromstedt M, Snaith M, Oresic M, Abel ED, Cannon B, Vidal-Puig A. Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance *PLoS Biol* 2006; 4: e369.
 356. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells *J Biol Chem* 2003; 278: 26597-26603.
 357. Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP *Biochem J* 2000; 345 Pt 2: 161-179.
 358. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression *FEBS Lett* 1997; 408: 39-42.
 359. Brun S, Carmona MC, Mampel T, Vinas O, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F. Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids *FEBS Lett* 1999; 453: 205-209.
 360. Hesselink MK, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Hultman E, Saris WH, Nieuwlaet R, Schaart G, Kornips E, Schrauwen P. Increased uncoupling protein 3 content does not affect mitochondrial function in human skeletal muscle in vivo *J Clin Invest* 2003; 111: 479-486.
 361. Boss O, Samec S, Desplanches D, Mayet MH, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat *FASEB J* 1998; 12: 335-339.
 362. Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, Laville M, Langin D. Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans *J Clin Invest* 1997; 100: 2665-2670.
 363. Schrauwen P, Hesselink MK. The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc Nutr Soc* 2004; 63: 287-292.
 364. Schrauwen P, Saris WH, Hesselink MK. An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix *FASEB J* 2001; 15: 2497-2502.

365. Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice *J Biol Chem* 2000; 275: 16258-16266.
366. Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman ML. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3 *J Biol Chem* 2000; 275: 16251-16257.
367. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia *Nat Genet* 1997; 15: 269-272.
368. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production *Nat Genet* 2000; 26: 435-439.
369. Harper ME, Gerrits MF. Mitochondrial uncoupling proteins as potential targets for pharmacological agents *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 603-607.
370. Frayn KN, Arner P, Yki-Jarvinen H. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease *Essays Biochem* 2006; 42: 89-103.
371. Voet D. *Metabolismo de los lípidos*. Editorial Médica Panamericana, 2007.
372. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation *J Lipid Res* 2002; 43: 1997-2006.
373. Cianflone K, Maslowska M, Sniderman A. The acylation stimulating protein-adipsin system *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19 Suppl 1: S34-S38.
374. Zammit VA, Buckett LK, Turnbull AV, Wure H, Proven A. Diacylglycerol acyltransferases: Potential roles as pharmacological targets *Pharmacol Ther* 2008; 118: 295-302.
375. Tong L, Harwood HJ, Jr. Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery *J Cell Biochem* 2006; 99: 1476-1488.
376. Pape ME, Lopez-Casillas F, Kim KH. Physiological regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression: effects of diet, diabetes, and lactation on acetyl-CoA carboxylase mRNA *Arch Biochem Biophys* 1988; 267: 104-109.
377. Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes *J Biol Chem* 1999; 274: 35832-35839.

378. Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 1059-1064.
379. Barber MC, Price NT, Travers MT. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa *Biochim Biophys Acta* 2005; 1733: 1-28.
380. Harwood HJ, Jr. Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition *Expert Opin Ther Targets* 2005; 9: 267-281.
381. Harwood HJ, Jr., Petras SF, Shelly LD, Zaccaro LM, Perry DA, Makowski MR, Hargrove DM, Martin KA, Tracey WR, Chapman JG, Magee WP, Dalvie DK, Soliman VF, Martin WH, Mularski CJ, Eisenbeis SA. Isozyme-nonselective N-substituted bipiperidylcarboxamide acetyl-CoA carboxylase inhibitors reduce tissue malonyl-CoA concentrations, inhibit fatty acid synthesis, and increase fatty acid oxidation in cultured cells and in experimental animals *J Biol Chem* 2003; 278: 37099-37111.
382. Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase *Prog Lipid Res* 2003; 42: 289-317.
383. Semenkovich CF. Regulation of fatty acid synthase (FAS) *Prog Lipid Res* 1997; 36: 43-53.
384. O'Brien RM, Granner DK. Regulation of gene expression by insulin *Physiol Rev* 1996; 76: 1109-1161.
385. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foulfelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis *Biochimie* 2004; 86: 839-848.
386. Paton CM, Ntambi JM. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E28-E37.
387. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl: S138-S143.
388. Lampidonis AD, Rogdakis E, Voutsinas GE, Stravopodis DJ. The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis *Gene* 2011; 477: 1-11.
389. Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1120-1124.
390. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores *Prog Lipid Res* 2011; 50: 14-27.
391. Sekiya M, Osuga J, Yahagi N, Okazaki H, Tamura Y, Igarashi M, Takase S, Harada K, Okazaki S, Iizuka Y, Ohashi K, Yagyu H, Okazaki M, Gotoda T, Nagai R, Kadowaki T, Shimano H, Yamada N, Ishibashi S. Hormone-sensitive lipase is involved in hepatic cholesteryl ester hydrolysis *J Lipid Res* 2008; 49: 1829-1838.

392. Carey GB. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis *Adv Exp Med Biol* 1998; 441: 157-170.
393. Lafontan M, Berlan M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis *Endocr Rev* 1995; 16: 716-738.
394. Chernogubova E, Hutchinson DS, Nedergaard J, Bengtsson T. Alpha1- and beta1-adrenoceptor signaling fully compensates for beta3-adrenoceptor deficiency in brown adipocyte norepinephrine-stimulated glucose uptake *Endocrinology* 2005; 146: 2271-2284.
395. Konkar AA, Zhai Y, Granneman JG. beta1-adrenergic receptors mediate beta3-adrenergic-independent effects of CGP 12177 in brown adipose tissue *Mol Pharmacol* 2000; 57: 252-258.
396. Olsson H, Stralfors P, Belfrage P. Phosphorylation of the basal site of hormone-sensitive lipase by glycogen synthase kinase-4 *FEBS Lett* 1986; 209: 175-180.
397. Greenberg AS, Shen WJ, Muliro K, Patel S, Souza SC, Roth RA, Kraemer FB. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway *J Biol Chem* 2001; 276: 45456-45461.
398. Garton AJ, Campbell DG, Carling D, Hardie DG, Colbran RJ, Yeaman SJ. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism *Eur J Biochem* 1989; 179: 249-254.
399. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis *Eur J Biochem* 1997; 244: 1-14.
400. Zammit VA. The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function *Biochem J* 1999; 343 Pt 3: 505-515.
401. Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E1039-E1044.
402. Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhill J, McGarry JD. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats *Diabetes* 2001; 50: 123-130.
403. Saggerson D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells *Annu Rev Nutr* 2008; 28: 253-272.
404. Brown NF, Hill JK, Esser V, Kirkland JL, Corkey BE, Foster DW, McGarry JD. Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes *Biochem J* 1997; 327 (Pt 1): 225-231.

405. Nyman LR, Cox KB, Hoppel CL, Kerner J, Barnoski BL, Hamm DA, Tian L, Schoeb TR, Wood PA. Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse *Mol Genet Metab* 2005; 86: 179-187.
406. Ji S, You Y, Kerner J, Hoppel CL, Schoeb TR, Chick WS, Hamm DA, Sharer JD, Wood PA. Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse *Mol Genet Metab* 2008; 93: 314-322.
407. Gao XF, Chen W, Kong XP, Xu AM, Wang ZG, Sweeney G, Wu D. Enhanced susceptibility of Cpt1c knockout mice to glucose intolerance induced by a high-fat diet involves elevated hepatic gluconeogenesis and decreased skeletal muscle glucose uptake *Diabetologia* 2009; 52: 912-920.
408. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. The contribution of animal models to the study of obesity *Lab Anim* 2008; 42: 413-432.
409. Ramachandrappa S, Farooqi IS. Genetic approaches to understanding human obesity *J Clin Invest* 2011; 121: 2080-2086.
410. Bunger L, Hill WG. Inbred lines of mice derived from long-term divergent selection on fat content and body weight *Mamm Genome* 1999; 10: 645-648.
411. Swallow JG, Koteja P, Carter PA, Garland T, Jr. Food consumption and body composition in mice selected for high wheel-running activity *J Comp Physiol B* 2001; 171: 651-659.
412. Nielsen MK, Freking BA, Jones LD, Nelson SM, Vorderstrasse TL, Hussey BA. Divergent selection for heat loss in mice: II. Correlated responses in feed intake, body mass, body composition, and number born through fifteen generations *J Anim Sci* 1997; 75: 1469-1476.
413. Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes *Diabetes* 2004; 53 Suppl 3: S215-S219.
414. Evans SA, Parsons AD, Overton JM. Homeostatic responses to caloric restriction: influence of background metabolic rate *J Appl Physiol* 2005; 99: 1336-1342.
415. Teske JA, Kotz CM. Effect of acute and chronic caloric restriction and metabolic glucoprivation on spontaneous physical activity in obesity-prone and obesity-resistant rats *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R176-R184.
416. Hambly C, Adams A, Fustin JM, Rance KA, Bunger L, Speakman JR. Mice with low metabolic rates are not susceptible to weight gain when fed a high-fat diet *Obes Res* 2005; 13: 556-566.
417. Johnston SL, Grune T, Bell LM, Murray SJ, Souter DM, Erwin SS, Yearsley JM, Gordon IJ, Illius AW, Kyriazakis I, Speakman JR. Having it all: historical energy intakes do not generate the anticipated trade-offs in fecundity *Proc Biol Sci* 2006; 273: 1369-1374.

418. Bauman DE, Currie WB. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis *J Dairy Sci* 1980; 63: 1514-1529.
419. Brunton PJ, Russell JA. The expectant brain: adapting for motherhood *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 11-25.
420. Augustine RA, Ladyman SR, Grattan DR. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy *J Physiol* 2008; 586: 387-397.
421. Ladyman SR, Grattan DR. 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* 2004; 145: 3704-3711.
422. Trujillo ML, Spuch C, Carro E, Senaris R. Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy *Endocrinology* 2011; 152: 1355-1365.
423. Mistry AM, Romsos DR. Intracerebroventricular leptin administration reduces food intake in pregnant and lactating mice *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227: 616-619.
424. Johnson MS, Thomson SC, Speakman JR. Limits to sustained energy intake. I. Lactation in the laboratory mouse *Mus musculus J Exp Biol* 2001; 204: 1925-1935.
425. Murphy SP, Abrams BF. Changes in energy intakes during pregnancy and lactation in a national sample of US women *Am J Public Health* 1993; 83: 1161-1163.
426. Herrera E, Lasuncion MA, Palacin M, Zorzano A, Bonet B. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era *Diabetes* 1991; 40 Suppl 2: 83-88.
427. Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model *Hum Reprod Update* 2003; 9: 531-539.
428. Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 180-193.
429. Bell AW, Bauman DE. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997; 2: 265-278.
430. Ramos MP, Crespo-Solans MD, del CS, Cacho J, Herrera E. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E318-E328.
431. Gonzalez CG, Alonso A, Balbin M, Diaz F, Fernandez S, Patterson AM. Effects of pregnancy on insulin receptor in liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats *Gynecol Endocrinol* 2002; 16: 193-205.

432. Herrera E, Lasuncion MA, Gomez-Coronado D, Aranda P, Lopez-Luna P, Maier I. Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 1575-1583.
433. Kawaguchi K, Sugiyama T, Hibasami H, Toyoda N. PPAR-gamma, TNF-alpha messenger RNA levels and lipase activity in the pregnant and lactating rat *Life Sci* 2003; 72: 1655-1663.
434. Wade GN, Gray JM. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis *Physiol Behav* 1979; 22: 583-593.
435. Caja S, Puerta M. White adipose tissue production and release of IL-6 and TNF-alpha do not parallel circulating and cerebrospinal fluid concentrations in pregnant rats *Horm Metab Res* 2008; 40: 375-380.
436. Garcia MC, Lopez M, Gualillo O, Seoane LM, Dieguez C, Senaris RM. Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin *FASEB J* 2003; 17: 1392-1400.
437. 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.
438. Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4276-4286.
439. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans *Nat Med* 1997; 3: 1029-1033.
440. Garcia MD, Casanueva FF, Dieguez C, Senaris RM. Gestational profile of leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the placenta and adipose tissue in the rat, and regulation of the mRNA levels of the leptin receptor subtypes in the hypothalamus during pregnancy and lactation *Biol Reprod* 2000; 62: 698-703.
441. Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. Synthesis of leptin in human placenta *Endocrinology* 1997; 138: 4501-4504.
442. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 11073-11078.
443. Malik NM, Carter ND, Wilson CA, Scaramuzzi RJ, Stock MJ, Murray JF. Leptin expression in the fetus and placenta during mouse pregnancy *Placenta* 2005; 26: 47-52.

- 444. Ladyman SR, Grattan DR. Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat *Endocrinology* 2005; 146: 3868-3874.
- 445. Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, Reitman M. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor *J Biol Chem* 1997; 272: 30546-30551.
- 446. Seeber RM, Smith JT, Waddell BJ. Plasma leptin-binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat *Biol Reprod* 2002; 66: 1762-1767.
- 447. Ladyman SR, Tups A, Augustine RA, Swahn-Azavedo A, Kokay IC, Grattan DR. Loss of hypothalamic response to leptin during pregnancy associated with development of melanocortin resistance *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 449-456.
- 448. Rocha M, Bing C, Williams G, Puerta M. Pregnancy-induced hyperphagia is associated with increased gene expression of hypothalamic agouti-related peptide in rats *Regul Pept* 2003; 114: 159-165.
- 449. Belgardt BF, Bruning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1212: 97-113.
- 450. Jovanovic Z, Yeo GS. Central leptin signalling: beyond the arcuate nucleus *Auton Neurosci* 2010; 156: 8-14.
- 451. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice *Nat Genet* 1996; 14: 95-97.
- 452. Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, Fu XY. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4661-4666.
- 453. Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG, Jr. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction *Nature* 2003; 421: 856-859.
- 454. Tups A. Physiological models of leptin resistance *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 961-971.
- 455. Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity *Nat Med* 2004; 10: 739-743.
- 456. Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzameli I, Bjorbaek C, Flier JS. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3 *Nat Med* 2004; 10: 734-738.

457. De Jonghe BC, Hayes MR, Banno R, Skibicka KP, Zimmer DJ, Bowen KA, Leichner TM, Alhadeff AL, Kanoski SE, Cyr NE, Nillni EA, Grill HJ, Bence KK. Deficiency of PTP1B in POMC neurons leads to alterations in energy balance and homeostatic response to cold exposure *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300: E1002-E1011.
458. Xue B, Pulinilkunnil T, Murano I, Bence KK, He H, Minokoshi Y, Asakura K, Lee A, Haj F, Furukawa N, Catalano KJ, Delibegovic M, Balschi JA, Cinti S, Neel BG, Kahn BB. Neuronal protein tyrosine phosphatase 1B deficiency results in inhibition of hypothalamic AMPK and isoform-specific activation of AMPK in peripheral tissues *Mol Cell Biol* 2009; 29: 4563-4573.
459. Anderson GM, Beijer P, Bang AS, Fenwick MA, Bunn SJ, Grattan DR. Suppression of prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5b signaling and induction of suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat during late pregnancy and lactation *Endocrinology* 2006; 147: 4996-5005.
460. Caminos JE, Bravo SB, Gonzalez CR, Garces MF, Cepeda LA, Gonzalez AC, Cordido F, Lopez M, Dieguez C. Food-intake-regulating-neuropeptides are expressed and regulated through pregnancy and following food restriction in rat placenta *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6: 14.
461. Mann PE, Rubin BS, Bridges RS. Differential proopiomelanocortin gene expression in the medial basal hypothalamus of rats during pregnancy and lactation *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 46: 9-16.
462. Ajala MO, Oladipo OO, Afonja OA. Hypothalamic neuropeptide Y mRNA in pregnant, lactating and suckling rats *Niger Postgrad Med J* 2001; 8: 16-21.
463. Oberto A, Mele P, Zammaretti F, Panzica G, Eva C. Evidence of altered neuropeptide Y content and neuropeptide Y1 receptor gene expression in the hypothalamus of pregnant transgenic mice *Endocrinology* 2003; 144: 4826-4830.
464. Makarova EN, Kochubei ED, Bazhan NM. Regulation of food consumption during pregnancy and lactation in mice *Neurosci Behav Physiol* 2010; 40: 263-267.
465. Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3240-3245.
466. Hassani OK, Lee MG, Jones BE. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 2418-2422.
467. Wu M, Dumalska I, Morozova E, van den Pol A, Alreja M. Melanin-concentrating hormone directly inhibits GnRH neurons and blocks kisspeptin

- activation, linking energy balance to reproduction *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 17217-17222.
468. Kanenishi K, Ueno M, Momose S, Kuwabara H, Tanaka H, Sato C, Kobayashi T, Hino O, Sakamoto H, Hata T. Prepro-orexin mRNA expression in the rat brain is increased during pregnancy *Neurosci Lett* 2004; 368: 73-77.
469. Sun G, Tian Z, Yao Y, Li H, Higuchi T. Central and/or peripheral immunoreactivity of orexin-A in pregnant rats and women *J Mol Endocrinol* 2006; 36: 131-138.
470. Knollema S, Brown ER, Vale W, Sawchenko PE. Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic Acid and Peptide expression in lactating rats *J Neuroendocrinol* 1992; 4: 709-717.
471. Brunton PJ, Russell JA, Douglas AJ. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 764-776.
472. Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Mendez M, Covarrubias L, Charli JL. Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats *Neuroendocrinology* 1991; 54: 493-498.
473. Knopp RH, Herrera E, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. 8. Metabolism of adipose tissue isolated from fed and fasted pregnant rats during late gestation *J Clin Invest* 1970; 49: 1438-1446.
474. Aitchison RE, Clegg RA, Vernon RG. Lipolysis in rat adipocytes during pregnancy and lactation. The response to noradrenaline *Biochem J* 1982; 202: 243-247.
475. Nolan CJ, Proietto J. The feto-placental glucose steal phenomenon is a major cause of maternal metabolic adaptation during late pregnancy in the rat *Diabetologia* 1994; 37: 976-984.
476. Martin-Hidalgo A, Holm C, Belfrage P, Schotz MC, Herrera E. Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy *Am J Physiol* 1994; 266: E930-E935.
477. Lopez-Luna P, Maier I, Herrera E. Carcass and tissue fat content in the pregnant rat *Biol Neonate* 1991; 60: 29-38.
478. Woollett LA. Origin of cholesterol in the fetal golden Syrian hamster: contribution of de novo sterol synthesis and maternal-derived lipoprotein cholesterol *J Lipid Res* 1996; 37: 1246-1257.
479. Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus *Eur J Clin Nutr* 2000; 54 Suppl 1: S47-S51.
480. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease *J Clin Invest* 2011; 121: 2111-2117.

481. Dahlgren J, Samuelsson AM, Jansson T, Holmang A. Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation *Pediatr Res* 2006; 60: 147-151.
482. Dahlgren J, Nilsson C, Jennische E, Ho HP, Eriksson E, Niklasson A, Bjorntorp P, Albertsson WK, Holmang A. Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E326-E334.
483. Samuelsson AM, Ohrn I, Dahlgren J, Eriksson E, Angelin B, Folkow B, Holmang A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in hypertension and increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult rats *Endocrinology* 2004; 145: 4897-4911.
484. Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women *Placenta* 2002; 23: 239-256.
485. Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) *Hum Reprod Update* 2008; 14: 335-344.
486. Hauguel-De MS, Guerre-Millo M. The placenta cytokine network and inflammatory signals *Placenta* 2006; 27: 794-798.
487. Agarwal R, Loganath A, Roy AC, Wong YC, Ng SC. Effect of T-helper 1 cytokines on secretion of T-helper 2 cytokines by term trophoblast cells in culture *Gynecol Endocrinol* 2000; 14: 305-310.
488. Deb S, Tessier C, Prigent-Tessier A, Barkai U, Ferguson-Gottschall S, Srivastava RK, Faliszek J, Gibori G. The expression of interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor, and gp130-kilodalton glycoprotein in the rat decidua and a decidual cell line: regulation by 17beta-estradiol and prolactin *Endocrinology* 1999; 140: 4442-4450.
489. Yamaguchi M, Ogren L, Southard JN, Kurachi H, Miyake A, Talamantes F. Interleukin 6 inhibits mouse placental lactogen II but not mouse placental lactogen I secretion in vitro *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11905-11909.
490. Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier *Neuroimmunomodulation* 1995; 2: 241-248.
491. Van Wagoner NJ, Oh JW, Repovic P, Benveniste EN. Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor *J Neurosci* 1999; 19: 5236-5244.
492. Juttler E, Tarabin V, Schwaninger M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity *Neuroscientist* 2002; 8: 268-275.
493. Frontera M, Pujol E, Rodriguez-Cuenca S, Catala-Niell A, Roca P, Garcia-Palmer FJ, Gianotti M. Rat brown adipose tissue thermogenic features are altered during mid-pregnancy *Cell Physiol Biochem* 2005; 15: 203-210.

494. Thompson SD, Nicoll ME. Basal metabolic rate and energetics of reproduction in therian mammals *Nature* 1986; 321: 690-693.
495. Cripps AW, Williams VJ. The effect of pregnancy and lactation on food intake, gastrointestinal anatomy and the absorptive capacity of the small intestine in the albino rat *Br J Nutr* 1975; 33: 17-32.
496. Speakman JR. The physiological costs of reproduction in small mammals *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008; 363: 375-398.
497. Cairnie AB, Bentley RE. Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. Hyperplasia during lactation *Exp Cell Res* 1967; 46: 428-440.
498. Casirola DM, Ferraris RP. Role of the small intestine in postpartum weight retention in mice *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 1178-1187.
499. Williamson DH, Lund P, Evans RD. Substrate selection and oxygen uptake by the lactating mammary gland *Proc Nutr Soc* 1995; 54: 165-175.
500. Collier RJ, McNamara JP, Wallace CR, Dehoff MH. A review of endocrine regulation of metabolism during lactation *J Anim Sci* 1984; 59: 498-510.
501. McNamara JP. Lipid metabolism in adipose tissue during lactation: a model of a metabolic control system *J Nutr* 1994; 124: 1383S-1391S.
502. Ota K, Yokoyama A. Body weight and food consumption of lactating rats nursing various sizes of litters *J Endocrinol* 1967; 38: 263-268.
503. Vernon RG, Pond CM. Adaptations of maternal adipose tissue to lactation *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997; 2: 231-241.
504. Burnol AF, Guerre-Millo M, Lavau M, Girard J. Effect of lactation on insulin sensitivity of glucose metabolism in rat adipocytes *FEBS Lett* 1986; 194: 292-296.
505. Burnol AF, Ebner S, Kande J, Girard J. Insulin resistance of glucose metabolism in isolated brown adipocytes of lactating rats. Evidence for a post-receptor defect in insulin action *Biochem J* 1990; 265: 511-517.
506. Walker AP, Flint DJ. Absence of down-regulation of the insulin receptor by insulin. A possible mechanism of insulin resistance in the rat *Biochem J* 1983; 210: 373-378.
507. Flint DJ, Clegg RA, Vernon RG. Prolactin and the regulation of adipose-tissue metabolism during lactation in rats *Mol Cell Endocrinol* 1981; 22: 265-275.
508. Barber MC, Travers MT, Finley E, Flint DJ, Vernon RG. Growth-hormone-prolactin interactions in the regulation of mammary and adipose-tissue acetyl-CoA carboxylase activity and gene expression in lactating rats *Biochem J* 1992; 285 (Pt 2): 469-475.

509. Vernon RG. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver *J Dairy Res* 2005; 72: 460-469.
510. 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.
511. Vernon RG, Denis RG, Sorensen A, Williams G. Leptin and the adaptations of lactation in rodents and ruminants *Horm Metab Res* 2002; 34: 678-685.
512. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin *Diabetes* 2003; 52: 268-276.
513. Josephs T, Waugh H, Kokay I, Grattan D, Thompson M. 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* 2007; 194: 305-312.
514. Xu J, Kirigiti MA, Grove KL, Smith MS. Regulation of food intake and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone during lactation: role of insulin and leptin *Endocrinology* 2009; 150: 4231-4240.
515. Pickavance L, Tadayyon M, Williams G, Vernon RG. Lactation suppresses diurnal rhythm of serum leptin *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 196-199.
516. Johnstone LE, Higuchi T. Food intake and leptin during pregnancy and lactation *Prog Brain Res* 2001; 133: 215-227.
517. Mitchell SE, Nogueiras R, Morris A, Tovar S, Grant C, Cruickshank M, Rayner DV, Dieguez C, Williams LM. Leptin receptor gene expression and number in the brain are regulated by leptin level and nutritional status *J Physiol* 2009; 587: 3573-3585.
518. Suzuki Y, Kurose Y, Takahashi H, Asakuma S, Azuma Y, Kobayashi S. The differences in feeding-inhibitory responses to peripheral and central leptin between non-lactating and lactating rats *J Endocrinol* 2010; 207: 105-111.
519. Brogan RS, Mitchell SE, Trayhurn P, Smith MS. Suppression of leptin during lactation: contribution of the suckling stimulus versus milk production *Endocrinology* 1999; 140: 2621-2627.
520. Denis RG, Williams G, Vernon RG. Regulation of serum leptin and its role in the hyperphagia of lactation in the rat *J Endocrinol* 2003; 176: 193-203.
521. Denis RG, Bing C, Brocklehurst S, Harrold JA, Vernon RG, Williams G. Diurnal changes in hypothalamic neuropeptide and SOCS-3 expression: effects of lactation and relationship with serum leptin and food intake *J Endocrinol* 2004; 183: 173-181.

522. Anderson ST, Barclay JL, Fanning KJ, Kusters DH, Waters MJ, Curlewis JD. Mechanisms underlying the diminished sensitivity to prolactin negative feedback during lactation: reduced STAT5 signaling and up-regulation of cytokine-inducible SH2 domain-containing protein (CIS) expression in tuberoinfundibular dopaminergic neurons *Endocrinology* 2006; 147: 1195-1202.
523. Roy AF, Benomar Y, Bailleux V, Vacher CM, Aubourg A, Gertler A, Djiane J, Taouis M. Lack of cross-desensitization between leptin and prolactin signaling pathways despite the induction of suppressor of cytokine signaling 3 and PTP-1B *J Endocrinol* 2007; 195: 341-350.
524. Malabu UH, Kilpatrick A, Ware M, Vernon RG, Williams G. Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of lactating rats: possible relationship to hyperphagia and adaptive changes in energy balance *Peptides* 1994; 15: 83-87.
525. Crowley WR, Ramoz G, Torto R, Keefe KA, Wang JJ, Kalra SP. Neuroendocrine actions and regulation of hypothalamic neuropeptide Y during lactation *Peptides* 2007; 28: 447-452.
526. Smith MS. Lactation alters neuropeptide-Y and proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat *Endocrinology* 1993; 133: 1258-1265.
527. Bi S, Robinson BM, Moran TH. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R1030-R1036.
528. Kawaguchi M, Scott KA, Moran TH, Bi S. Dorsomedial hypothalamic corticotropin-releasing factor mediation of exercise-induced anorexia *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R1800-R1805.
529. Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH. A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R254-R260.
530. Guan XM, Yu H, Van der Ploeg LH. Evidence of altered hypothalamic pro-opiomelanocortin/ neuropeptide Y mRNA expression in tubby mice *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 59: 273-279.
531. Kesterson RA, Huszar D, Lynch CA, Simerly RB, Cone RD. Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome *Mol Endocrinol* 1997; 11: 630-637.
532. Tritos NA, Elmquist JK, Mastaitis JW, Flier JS, Maratos-Flier E. Characterization of expression of hypothalamic appetite-regulating peptides in obese hyperleptinemic brown adipose tissue-deficient (uncoupling protein-promoter-driven diphtheria toxin A) mice *Endocrinology* 1998; 139: 4634-4641.
533. Pape JR, Tramu G. Suckling-induced changes in neuropeptide Y and proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat: evaluation of a putative intervention of prolactin *Neuroendocrinology* 1996; 63: 540-549.

534. Li C, Chen P, Smith MS. The acute suckling stimulus induces expression of neuropeptide Y (NPY) in cells in the dorsomedial hypothalamus and increases NPY expression in the arcuate nucleus *Endocrinology* 1998; 139: 1645-1652.
535. Xu J, Kirigiti MA, Cowley MA, Grove KL, Smith MS. Suppression of basal spontaneous gonadotropin-releasing hormone neuronal activity during lactation: role of inhibitory effects of neuropeptide Y *Endocrinology* 2009; 150: 333-340.
536. Chen P, Smith MS. Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin *Endocrinology* 2004; 145: 823-829.
537. Gammie SC, Negron A, Newman SM, Rhodes JS. Corticotropin-releasing factor inhibits maternal aggression in mice *Behav Neurosci* 2004; 118: 805-814.
538. Walker CD, Toufexis DJ, Burlet A. Hypothalamic and limbic expression of CRF and vasopressin during lactation: implications for the control of ACTH secretion and stress hyposponsiveness *Prog Brain Res* 2001; 133: 99-110.
539. Windle RJ, Wood S, Shanks N, Perks P, Conde GL, Da Costa AP, Ingram CD, Lightman SL. Endocrine and behavioural responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity *J Neuroendocrinol* 1997; 9: 407-414.
540. Shanks N, Windle RJ, Perks P, Wood S, Ingram CD, Lightman SL. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxin is attenuated during lactation *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 857-865.
541. Lightman SL, Young WS, III. Vasopressin, oxytocin, dynorphin, enkephalin and corticotrophin-releasing factor mRNA stimulation in the rat *J Physiol* 1987; 394: 23-39.
542. Fischer D, Patchev VK, Hellbach S, Hassan AH, Almeida OF. Lactation as a model for naturally reversible hypercorticalism plasticity in the mechanisms governing hypothalamo-pituitary- adrenocortical activity in rats *J Clin Invest* 1995; 96: 1208-1215.
543. Walker CD, Tilders FJ, Burlet A. Increased colocalization of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in paraventricular neurones of the hypothalamus in lactating rats: evidence from immunotargeted lesions and immunohistochemistry *J Neuroendocrinol* 2001; 13: 74-85.
544. Lightman SL, Young WS, III. Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone and oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotropin-releasing factor and enkephalin messenger ribonucleic acids *Endocrinology* 1989; 124: 2358-2364.
545. Douglas AJ, Brunton PJ, Bosch OJ, Russell JA, Neumann ID. Neuroendocrine responses to stress in mice: hyposponsiveness in pregnancy and parturition *Endocrinology* 2003; 144: 5268-5276.

546. Fox SR, Smith MS. The suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion during lactation in the rat *Endocrinology* 1984; 115: 2045-2051.
547. Bridges RS. The role of lactogenic hormones in maternal behavior in female rats *Acta Paediatr Suppl* 1994; 397: 33-39.
548. Oberkotter LV, Rasmussen KM. Changes in plasma thyroid hormone concentrations in chronically food-restricted female rats and their offspring during suckling *J Nutr* 1992; 122: 435-441.
549. Fukuda H, Ohshima K, Mori M, Kobayashi I, Greer MA. Sequential changes in the pituitary-thyroid axis during pregnancy and lactation in the rat *Endocrinology* 1980; 107: 1711-1716.
550. Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I, Astier H. Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats *Neuroendocrinology* 1983; 37: 225-228.
551. Sanchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacarias M, Morales-Chapa C, Charli JL, Joseph-Bravo P. Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus *Neuroendocrinology* 2001; 74: 407-422.
552. van Haasteren GA, van TH, Klootwijk W, Handler B, Linkels E, van der Schoot P, van OJ, de Jong FH, Visser TJ, de Greef WJ. Studies on the role of TRH and corticosterone in the regulation of prolactin and thyrotrophin secretion during lactation *J Endocrinol* 1996; 148: 325-336.
553. Brogan RS, Grove KL, Smith MS. Differential regulation of leptin receptor but not orexin in the hypothalamus of the lactating rat *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 1077-1086.
554. Sun G, Tian Z, Murata T, Narita K, Honda K, Higuchi T. Central and peripheral immunoreactivity of melanin-concentrating hormone in hypothalamic obese and lactating rats *J Neuroendocrinol* 2004; 16: 79-83.
555. Silveyra P, Catalano PN, Lux-Lantos V, Libertun C. Impact of proestrous milieu on expression of orexin receptors and prepro-orexin in rat hypothalamus and hypophysis: actions of Cetrorelix and Nembutal *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E820-E828.
556. Dewey KG. Energy and protein requirements during lactation *Annu Rev Nutr* 1997; 17: 19-36.
557. Trayhurn P. Decreased capacity for non-shivering thermogenesis during lactation in mice *Pflugers Arch* 1983; 398: 264-265.
558. Martin I, Giralt M, Vinas O, Iglesias R, Mampel T, Villarroya F. Adaptive decrease in expression of the mRNA for uncoupling protein and subunit II of cytochrome c oxidase in rat brown adipose tissue during pregnancy and lactation *Biochem J* 1989; 263: 965-968.

559. Pedraza N, Solanes G, Iglesias R, Vazquez M, Giralt M, Villarroya F. Differential regulation of expression of genes encoding uncoupling proteins 2 and 3 in brown adipose tissue during lactation in mice *Biochem J* 2001; 355: 105-111.
560. Trayhurn P, Jennings G. Functional atrophy of brown adipose tissue during lactation in mice. Effects of lactation and weaning on mitochondrial GDP binding and uncoupling protein *Biochem J* 1987; 248: 273-276.
561. Isler D, Trayhurn P, Lunn PG. Brown adipose tissue metabolism in lactating rats: the effect of litter size *Ann Nutr Metab* 1984; 28: 101-109.
562. Villarroya F, Felipe A, Mampel T. Reduced noradrenaline turnover in brown adipose tissue of lactating rats *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1987; 86: 481-483.
563. Pedraza N, Solanes G, Carmona MC, Iglesias R, Vinas O, Mampel T, Vazquez M, Giralt M, Villarroya F. Impaired expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle during lactation: fibrates and troglitazone reverse lactation-induced downregulation of the uncoupling protein-3 gene *Diabetes* 2000; 49: 1224-1230.
564. Turcotte LP, Srivastava AK, Chiasson JL. Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP(PM)) in red skeletal muscle *Mol Cell Biochem* 1997; 166: 153-158.
565. Xiao XQ, Grove KL, Grayson BE, Smith MS. Inhibition of uncoupling protein expression during lactation: role of leptin *Endocrinology* 2004; 145: 830-838.
566. Burnol AF, Ferre P, Leturque A, Girard J. Effect of insulin on in vivo glucose utilization in individual tissues of anesthetized lactating rats *Am J Physiol* 1987; 252: E183-E188.
567. Carrascosa JM, Ramos P, Molero JC, Herrera E. Changes in the kinase activity of the insulin receptor account for an increased insulin sensitivity of mammary gland in late pregnancy *Endocrinology* 1998; 139: 520-526.
568. Xiao XQ, Grove KL, Smith MS. Metabolic adaptations in skeletal muscle during lactation: complementary deoxyribonucleic acid microarray and real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression *Endocrinology* 2004; 145: 5344-5354.
569. Gutgesell A, Ringseis R, Brandsch C, Stangl GI, Hirche F, Eder K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and enzymes of carnitine biosynthesis in the liver are down-regulated during lactation in rats *Metabolism* 2009; 58: 226-232.
570. Zammit VA. The effect of glucagon treatment and starvation of virgin and lactating rats on the rates of oxidation of octanoyl-L-carnitine and octanoate by isolated liver mitochondria *Biochem J* 1980; 190: 293-300.
571. Moretto VL, Ballen MO, Goncalves TS, Kawashita NH, Stoppiglia LF, Veloso RV, Latorraca MQ, Martins MS, Gomes-da-Silva MH. Low-Protein Diet during

- Lactation and Maternal Metabolism in Rats ISRN Obstet Gynecol 2011; 2011: 876502.
572. Zammit VA. Ketogenesis in the liver of ruminants - adaptations to a challenge. In: 1990: 155-162.
573. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice Nature 1994; 368: 339-342.
574. Fernandez-Guasti A, Picazo O. Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone Psychoneuroendocrinology 1992; 17: 681-689.
575. Hafez ESE. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. In: Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1970.
576. Green EL (Ed). *Biology of the laboratory mouse*. In: ed. Dover Publications, New York, 1975.
577. Monaco E. Morphological and Transcriptomic Comparison of Adipose and Bone Marrow Derived Porcine Stem Cells The Open Tissue Engineering & Regenerative Medicine Journal 2009.
578. Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Riechert U, Handel M, Kriebitzsch J, Holtt V. Rational design of oligonucleotide probes to avoid optimization steps in in situ hybridization Brain Res Brain Res Protoc 1999; 4: 82-91.
579. Kadkol SS, Gage WR, Pasternack GR. In situ hybridization-theory and practice Mol Diagn 1999; 4: 169-183.
580. Broberger C. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y Brain Res 1999; 848: 101-113.
581. Wang H, Storlien LH, Huang XF. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression Am J Physiol Endocrinol Metab 2002; 282: E1352-E1359.
582. Yamamoto Y, Ueta Y, Date Y, Nakazato M, Hara Y, Serino R, Nomura M, Shibuya I, Matsukura S, Yamashita H. Down regulation of the prepro-orexin gene expression in genetically obese mice Brain Res Mol Brain Res 1999; 65: 14-22.
583. Nomura M, Saito J, Ueta Y, Muglia LJ, Pfaff DW, Ogawa S. Enhanced up-regulation of corticotropin-releasing hormone gene expression in response to restraint stress in the hypothalamic paraventricular nucleus of oxytocin gene-deficient male mice J Neuroendocrinol 2003; 15: 1054-1061.
584. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Nature 1970; 227: 680-685.

585. James G.Fox. The mouse in biomedical research. 2007.
586. Di Gregorio GB, Hensley L, Lu T, Ranganathan G, Kern PA. Lipid and carbohydrate metabolism in mice with a targeted mutation in the IL-6 gene: absence of development of age-related obesity *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E182-E187.
587. Cinti S. Anatomy of the adipose organ *Eat Weight Disord* 2000; 5: 132-142.
588. Wallenius V, Wallenius K, Hisaoka M, Sandstedt J, Ohlsson C, Kopf M, Jansson JO. Retarded liver growth in interleukin-6-deficient and tumor necrosis factor receptor-1-deficient mice *Endocrinology* 2001; 142: 2953-2960.
589. Richard D, Trayhurn P. Energetic efficiency during pregnancy in mice fed ad libitum or pair-fed to the normal energy intake of unmated animals *J Nutr* 1985; 115: 593-600.
590. Feingold KR, Moser AH. Effect of lactation on cholesterol synthesis in rats *Am J Physiol* 1985; 249: G203-G208.
591. Li G, Klein RL, Matheny M, King MA, Meyer EM, Scarpace PJ. 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* 2002; 115: 879-889.
592. Agarwal R, Loganath A, Roy AC, Wong YC, Lindoff C, Ng SC. Increased expression of interleukin 6 in term compared to the first trimester human placental villi *Horm Metab Res* 2000; 32: 164-168.
593. Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus *Neuroendocrinology* 1993; 58: 140-145.
594. Andrews JF, Richard D, Jennings G, Trayhurn P. Brown adipose tissue thermogenesis during pregnancy in mice *Ann Nutr Metab* 1986; 30: 87-93.
595. Trayhurn P, Wusteman MC. Apparent dissociation between sympathetic activity and brown adipose tissue thermogenesis during pregnancy and lactation in golden hamsters *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65: 2396-2399.
596. Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Gianotti M, Proenza AM, Roca P. Expression of mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced specifically by 17beta-estradiol, testosterone, and progesterone *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E340-E346.
597. Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee J, Shoelson SE. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 240-245.
598. Abelenda M, Puerta ML. Inhibition of diet-induced thermogenesis during pregnancy in the rat *Pflugers Arch* 1987; 409: 314-317.

599. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation *Cell Metab* 2006; 3: 333-341.
600. Liu D, Zhang Z, Gladwell W, Teng CT. Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements *Endocrinology* 2003; 144: 4894-4904.
601. Barbano MF, Cador M. Various aspects of feeding behavior can be partially dissociated in the rat by the incentive properties of food and the physiological state *Behav Neurosci* 2005; 119: 1244-1253.
602. Bartness TJ, Keen-Rhinehart E, Dailey MJ, Teubner BJ. Neural and hormonal control of food hoarding *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 301: R641-R655.
603. Ponce-Castaneda MV, Lopez-Casillas F, Kim KH. Acetyl-coenzyme A carboxylase messenger ribonucleic acid metabolism in liver, adipose tissues, and mammary glands during pregnancy and lactation *J Dairy Sci* 1991; 74: 4013-4021.
604. Sinnett-Smith PA, Vernon RG, Mayer RJ. Lipogenic enzymes in rat maternal adipose tissue in the perinatal period *Biochem J* 1980; 186: 937-944.
605. Grimbert S, Fromenty B, Fisch C, Letteron P, Berson A, Durand-Schneider AM, Feldmann G, Pessayre D. Decreased mitochondrial oxidation of fatty acids in pregnant mice: possible relevance to development of acute fatty liver of pregnancy *Hepatology* 1993; 17: 628-637.
606. Zammit VA. Regulation of hepatic fatty acid metabolism. The activities of mitochondrial and microsomal acyl-CoA:sn-glycerol 3-phosphate O-acyltransferase and the concentrations of malonyl-CoA, non-esterified and esterified carnitine, glycerol 3-phosphate, ketone bodies and long-chain acyl-CoA esters in livers of fed or starved pregnant, lactating and weaned rats *Biochem J* 1981; 198: 75-83.
607. Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1212: E1-E19.
608. Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010; 86: 717-730.
609. Lyngso D, Simonsen L, Bulow J. Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue *J Physiol* 2002; 543: 379-386.
610. Glund S, Krook A. Role of interleukin-6 signalling in glucose and lipid metabolism *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 192: 37-48.
611. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, Moraes JC, Prada PO, Guadagnini D, Marin RM, Oliveira AG, Augusto TM, Carvalho HF, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira JB. IL-6 and IL-10 anti-

inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition PLoS Biol 2010; 8.

612. de Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus *Endocrinology* 2005; 146: 4192-4199.
613. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity *J Neurosci* 2009; 29: 359-370.
614. Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 152-156.
615. Mooney RA. Counterpoint: Interleukin-6 does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis *J Appl Physiol* 2007; 102: 816-818.
616. Pedersen BK, Febbraio MA. Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis *J Appl Physiol* 2007; 102: 814-816.
617. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders *Nature* 2006; 444: 860-867.
618. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion *Obes Res* 2001; 9: 414-417.
619. Pedersen BK. Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases *Brain Behav Immun* 2011; 25: 811-816.
620. Hidalgo J, Florit S, Giralt M, Ferrer B, Keller C, Pilegaard H. Transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-6 are resistant to high-fat diet-induced increases in body weight and body fat *Brain Behav Immun* 2010; 24: 119-126.
621. Vallieres L, Rivest S. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta *J Neurochem* 1997; 69: 1668-1683.
622. Johnston GR, Webster NR. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve *Br J Anaesth* 2009; 102: 453-462.
623. Licinio J, Wong ML. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system *J Clin Invest* 1997; 100: 2941-2947.
624. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22: 1145-1158.

625. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications *Diabetes* 2007; 56: 2910-2918.
626. Gil A, Olza J, Gil-Campos M, Gomez-Llorente C, Aguilera CM. Is adipose tissue metabolically different at different sites? *Int J Pediatr Obes* 2011; 6 Suppl 1: 13-20.
627. Brandt C, Jakobsen AH, Adser H, Olesen J, Iversen N, Kristensen JM, Hojman P, Wojtaszewski JF, Hidalgo J, Pilegaard H. IL-6 regulates exercise and training-induced adaptations in subcutaneous adipose tissue in mice *Acta Physiol (Oxf)* 2011.
628. Cinti S. Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease . In: Elsevier, 2007: 13-19.
629. Morroni M, Giordano A, Zingaretti MC, Boiani R, De MR, Kahn BB, Nisoli E, Tonello C, Pisoschi C, Luchetti MM, Marelli M, Cinti S. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16801-16806.
630. Lager S, Asterholm IW, Schele E, Jansson N, Nilsson S, Jansson JO, Lonn M, Holmang A. Perinatal lack of maternal IL-6 promotes increased adiposity during adulthood in mice *Endocrinology* 2011; 152: 1336-1346.
631. Aoki N, Kawamura M, Matsuda T. Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland *Biochim Biophys Acta* 1999; 1427: 298-306.
632. Thorn SR, Giesy SL, Myers MG, Jr., Boisclair YR. Mammary ductal growth is impaired in mice lacking leptin-dependent signal transducer and activator of transcription 3 signaling *Endocrinology* 2010; 151: 3985-3995.
633. Sanchez J, Oliver P, Miralles O, Ceresi E, Pico C, Palou A. Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding *Endocrinology* 2005; 146: 2575-2582.
634. Barkley MS, Geschwind II, Bradford GE. The gestational pattern of estradiol, testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice *Biol Reprod* 1979; 20: 733-738.
635. Shao R, Nutu M, Karlsson-Lindahl L, Benrick A, Weijdegard B, Lager S, Egecioglu E, Fernandez-Rodriguez J, Gemzell-Danielsson K, Ohlsson C, Jansson JO, Billig H. Downregulation of cilia-localized IL-6R alpha by 17beta-estradiol in mouse and human fallopian tubes *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297: C140-C151.
636. Canellada A, Alvarez I, Berod L, Gentile T. Estrogen and progesterone regulate the IL-6 signal transduction pathway in antibody secreting cells *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 111: 255-261.

637. Ladyman SR, Augustine RA, Grattan DR. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 805-817.
638. De M, Sanford TH, Wood GW. Detection of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the uterus during the second half of pregnancy in the mouse *Endocrinology* 1992; 131: 14-20.
639. Boelen A, Kwakkel J, Wiersinga WM, Fliers E. Chronic local inflammation in mice results in decreased TRH and type 3 deiodinase mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus independently of diminished food intake *J Endocrinol* 2006; 191: 707-714.
640. Pekary AE, Stevens SA, Sattin A. Lipopolysaccharide modulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and TRH-like peptide levels in rat brain and endocrine organs *J Mol Neurosci* 2007; 31: 245-259.
641. Smith MS, Grove KL. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model *Front Neuroendocrinol* 2002; 23: 225-256.
642. Gammie SC, Hasen NS, Awad TA, Auger AP, Jessen HM, Panksepp JB, Bronikowski AM. Gene array profiling of large hypothalamic CNS regions in lactating and randomly cycling virgin mice *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 139: 201-211.
643. Eliason HL, Fewell JE. Thermoregulatory control during pregnancy and lactation in rats *J Appl Physiol* 1997; 83: 837-844.
644. Fewell JE. Body temperature regulation in rats near term of pregnancy *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 364-368.
645. Adels LE, Leon M. Thermal control of mother-young contact in Norway rats: factors mediating the chronic elevation of maternal temperature *Physiol Behav* 1986; 36: 183-196.
646. Adels LE, Leon M, Wiener SG, Smith MS. Endocrine response to acute cold exposure by lactating and non-lactating Norway rats *Physiol Behav* 1986; 36: 179-181.
647. Wang J, Ando T, Dunn AJ. Effect of homologous interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha on the core body temperature of mice *Neuroimmunomodulation* 1997; 4: 230-236.
648. Agius L, Williamson DH. Lipogenesis in interscapular brown adipose tissue of virgin, pregnant and lactating rats. The effects of intragastric feeding *Biochem J* 1980; 190: 477-480.
649. Burysek L, Houstek J. beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes *FEBS Lett* 1997; 411: 83-86.
650. Moinat M, Deng C, Muzzin P, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Dulloo AG, Giacobino JP. Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues *FEBS Lett* 1995; 373: 131-134.

651. Villarroya F, Felipe A, Mampel T. Sequential changes in brown adipose tissue composition, cytochrome oxidase activity and GDP binding throughout pregnancy and lactation in the rat *Biochim Biophys Acta* 1986; 882: 187-191.
652. Nieuwenhuizen AG, Schuiling GA, Bonen A, Paans AM, Vaalburg W, Koiter TR. Glucose consumption by various tissues in pregnant rats: effects of a 6-day euglycaemic hyperinsulinaemic clamp *Acta Physiol Scand* 1998; 164: 325-334.
653. Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguere V, Kralli A. Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 1418-1423.
654. Tremblay AM, Giguere V. The NR3B subgroup: an overview *Nucl Recept Signal* 2007; 5: e009.
655. Monjo M, Rodriguez AM, Palou A, Roca P. Direct effects of testosterone, 17 beta-estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis *Endocrinology* 2003; 144: 4923-4930.
656. Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 *Endocrinology* 2000; 141: 649-656.
657. 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.
658. Lacasa D, Le L, X, Ferre P, Dugail I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue *J Biol Chem* 2001; 276: 11512-11516.
659. Rodriguez AM, Monjo M, Roca P, Palou A. Opposite actions of testosterone and progesterone on UCP1 mRNA expression in cultured brown adipocytes *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1714-1723.
660. Ju D, He J, Zhao L, Zheng X, Yang G. Estrogen related receptor alpha-induced adipogenesis is PGC-1beta-dependent *Mol Biol Rep* 2011.
661. Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Yagi K, Okazaki Y, Inoue S. Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 813-818.
662. Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, Mangelsdorf DJ, Evans RM. A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2466-2477.

- 663. Suliman HB, Sweeney TE, Withers CM, Piantadosi CA. Co-regulation of nuclear respiratory factor-1 by NFkappaB and CREB links LPS-induced inflammation to mitochondrial biogenesis *J Cell Sci* 2010; 123: 2565-2575.
- 664. Trayhurn P, Mercer SW. Brown adipose tissue thermogenesis in obese animals *Biochem Soc Trans* 1986; 14: 236-239.
- 665. Quek VS, Trayhurn P. Calorimetric study of the energetics of pregnancy in golden hamsters *Am J Physiol* 1990; 259: R807-R812.
- 666. Trayhurn P, Douglas JB, McGuckin MM. Brown adipose tissue thermogenesis is 'suppressed' during lactation in mice *Nature* 1982; 298: 59-60.
- 667. Zhang L, Sugiyama T, Murabayashi N, Umekawa T, Ma N, Kamimoto Y, Ogawa Y, Sagawa N. The inflammatory changes of adipose tissue in late pregnant mice *J Mol Endocrinol* 2011; 47: 157-165.
- 668. Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels *J Biol Chem* 1989; 264: 9030-9038.
- 669. Raynolds MV, Awald PD, Gordon DF, Gutierrez-Hartmann A, Rule DC, Wood WM, Eckel RH. Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1416-1422.
- 670. Bruce CR, Dyck DJ. Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E616-E621.
- 671. Sweeney TR, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Decreased nuclear hormone receptor expression in the livers of mice in late pregnancy *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E1313-E1320.
- 672. Heubi JE, Partin JC, Partin JS, Schubert WK. Reye's syndrome: current concepts *Hepatology* 1987; 7: 155-164.