

UNIVERSIDAD CEU SAN PABLO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON ENGLITAZONA SOBRE
LA RESPUESTA A LA INSULINA EN LA RATA GESTANTE
Y SU DESCENDENCIA.**

TESIS DOCTORAL

JULIO SEVILLANO FERNÁNDEZ

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD CEU SAN PABLO
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON ENGLITAZONA SOBRE
LA RESPUESTA A LA INSULINA EN LA RATA GESTANTE
Y SU DESCENDENCIA.**

Memoria presentada por

JULIO SEVILLANO FERNÁNDEZ

para optar al grado de Doctor en Farmacia

Madrid, 2009

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento por la ayuda prestada a todas las personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de este trabajo.

A la Dra. María del Pilar Ramos Álvarez por darme la oportunidad de conocer el campo de la investigación universitaria. Asimismo, agradezco tu paciencia, dedicación y tutela demostrada día a día en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Carlos Bocos de Prada, por su tutela durante el desarrollo y la corrección de este trabajo.

Al Dr. Emilio Herrera Castellón, por compartir sus valiosos conocimientos, por toda la ayuda recibida y por la confianza puesta en mí.

A las Dras M^a Soledad Fernández-Alfonso y M^a Carmen González de la Universidad Autónoma de Madrid por enseñarme, ayudarme y permitirme realizar los experimentos de función vascular en sus instalaciones.

A Marta Gual Soler, el Dr. Francesc Villarroya y la Dra. Marta Giralt de la Facultad de Biología de la Universitat de Barcelona, por haber realizado el estudio del análisis histológico del tejido adiposo marrón en sus instalaciones.

A la Universidad CEU-San Pablo y a la Fundación Ramón Areces por las becas concedidas para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Al departamento de Biología y a la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU San Pablo, por la proporción de los servicios técnicos necesarios para el desarrollo de este trabajo y por permitirme iniciarme en la docencia universitaria.

A mi familia, a todos mis compañeros y amigos (dentro y fuera del mundo laboral) que han contribuido directa o indirectamente a la realización de este trabajo.

A mis padres

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
	2
1. LA INSULINA Y SU MECANISMO DE ACCIÓN HORMONAL	2
1.1. Cascada de señalización de la insulina	2
1.1.1. Vía de la fosfatidil inositol 3-quinasa	4
1.1.2. Vía de las MAP quinasas (MAP-K)	6
1.2. Funciones fisiológicas de la insulina	7
1.2.1. Estimulación del transporte de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina	7
1.2.2. Regulación sobre el metabolismo del glucógeno hepático	7
1.2.3. Gluconeogénesis	7
1.2.4. Efecto de la insulina en la lipogénesis	8
1.2.5. Mecanismo de acción antilipolítico de la insulina	8
2. RESISTENCIA A LA INSULINA	9
2.1. Implicación del tejido adiposo en el desarrollo de la resistencia a la insulina	9
2.1.1. Ácidos grasos libres y resistencia a la insulina.	10
2.1.2. Adipoquinas y resistencia a la insulina.	11
<i>Factor de necrosis tumoral-α (TNFα).</i>	11
<i>Leptina</i>	12
<i>Inhibidor del activador del plasminógeno-1</i>	12
<i>Interleuquina-6</i>	13
<i>Resistina</i>	13
<i>Adiponectina</i>	14
<i>Interacciones entre las adipoquinas</i>	15
Antidiabéticos orales	15
3. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES (PPAR)	16
3.1. Clasificación	16
3.2. Expresión tisular de los receptores PPAR	17
3.3. Funciones generales	17
3.4. Receptor activado por proliferadores peroxisomales tipo γ	18
3.4.1. Estructura	18
3.4.2. Isotipos del receptor PPAR γ	19
3.4.3. Ligandos del receptor PPAR γ	19

<i>a) Ligandos naturales</i>	19
<i>b) Ligandos sintéticos</i>	20
3.5. Modulación de la transcripción por PPARγ	20
3.6. Funciones del PPARγ	21
3.6.1. Diferenciación del adipocito	21
3.6.2. Metabolismo lipídico	23
3.6.3. Regulación de la homeostasis glucídica	24
3.6.4. Regulación de la secreción de citoquinas	24
<i>a) Efectos sobre el TNFα</i>	25
<i>b) Efectos sobre la leptina</i>	25
<i>c) Efectos sobre la resistina</i>	25
<i>d) Efectos sobre la adiponectina</i>	25
4. GESTACIÓN	26
4.1. Cambios metabólicos y hormonales durante la primera etapa de la gestación.	26
4.1.1. Hiperfagia	27
4.1.2. Aumento en la litogénesis	27
4.1.3. Aumento en la actividad LPL:	27
4.1.4. Aumento en la sensibilidad a la insulina	27
4.2. Cambios metabólicos y hormonales durante la última fase de la gestación.	28
4.2.1. Hipoglucemia	29
4.2.2. Cambios hormonales	29
4.2.3. Hiperlipemia	30
4.2.4. Hiperinsulinemia y resistencia a la insulina	30
4.2.5. Origen de la resistencia a la insulina en la gestación	31
<u>OBJETIVOS</u>	34
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	36
1. <u>ANIMALES</u>	37
1.1. Tratamiento de los animales	37
2. <u>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</u>	39

2.1. Parámetros plasmáticos	39
2.1.1 Determinación de glucosa en plasma	39
2.1.2 Determinación de glicerol en plasma	39
2.1.3 Determinación de NEFA en plasma	40
2.1.4 Determinación de triglicéridos en plasma	40
2.1.5 Determinación de insulina en plasma	40
2.1.6 Determinación de leptina en plasma	41
2.1.7 Determinación de IGF-1 en plasma	41
2.1.8 Determinación de adiponectina en plasma	41
2.1.9 Determinación de resistina en plasma	42
2.2. <u>Test de sobrecarga oral de glucosa</u>	42
2.3. <u>Cálculo de los índices de sensibilidad a la insulina</u>	43
2.4. <u>Presión arterial</u>	43
2.5. <u>Estudio de la reactividad vascular en el lecho mesentérico</u>	43
2.5.1 Estudio de la respuesta a factores vasoconstrictores derivados de endotelio	43
2.5.2 Estudio de la respuesta vasodilatadora	44
2.5.3 Estudio del efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora	44
2.5.4 Estudio del efecto de la inhibición de canales de potasio	44
2.6. <u>Parámetros tisulares</u>	44
2.6.1 Extracción de lípidos totales	44
2.6.2 Estudio histológico del tejido adiposo marrón	45
2.6.3 Western Blot e inmunodetección	45
2.7. <u>Expresión de los resultados y cálculos estadísticos</u>	47
	48
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	
<u>CAPÍTULO I</u>	49
2. <u>EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ENGLITAZONA EN LAS RATAS GESTANTES DE 20 DÍAS</u>	49
2.1. Efecto del tratamiento con englitazona sobre los parámetros corporales de las ratas gestantes de 20 días	50
2.2. Efecto del tratamiento con englitazona sobre los valores plasmáticos de las ratas gestantes de 20 días	51
1.1.1 Glucosa e insulina plasmáticas.	51

1.1.2	Test de sobrecarga oral de glucosa	52
1.1.3	Lípidos plasmáticos	54
1.1.4	Leptina e IGF-1 plasmáticos	55
1.1.5	Adiponectina plasmática y tisular	55
1.1.6	Resistina plasmática y tisular	56
2.3.	Efecto del tratamiento con englitazona sobre la señalización de la insulina en el tejido adiposo lumbar de ratas gestantes de 20 días	58
3.	<u>CAPÍTULO II EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ENGLITAZONA EN LA DESCENDENCIA</u>	61
3.1.	Efecto del tratamiento con englitazona sobre los parámetros corporales, metabólicos y hormonales de la descendencia	62
3.1.1	Parámetros corporales, metabólicos y hormonales de fetos y neonatos	62
	<i>a) Peso de los fetos y neonatos</i>	62
	<i>b) Bioquímica plasmática</i>	63
	Leptina e IGF1 plasmáticos	63
	Glucosa e insulina plasmáticas	64
	Lípidos plasmáticos	66
	<i>c) Peso y contenido lipídico del hígado y tejido adiposo marrón</i>	67
3.1.2	Parámetros corporales, metabólicos y hormonales en la lactancia y la edad adulta	69
	<i>a) Peso corporal durante la lactancia.</i>	69
	<i>b) Evolución del peso corporal tras la lactancia.</i>	70
	<i>c) Peso y contenido lipídico de los tejidos</i>	71
	<i>d) Parámetros plasmáticos en la lactancia y la edad adulta</i>	75
	<i>Glucemia e insulinemia</i>	75
	<i>Tests de sobrecarga oral de glucosa</i>	77
	<i>Parámetros lipídicos durante el desarrollo</i>	82
3.2.	Caracterización molecular en la descendencia del efecto sobre la señalización de la insulina del tratamiento con englitazona a las ratas gestantes	84
3.2.1	Músculo esquelético	84
3.2.2	Tejido adiposo lumbar	87
3.3.	Efecto del tratamiento con englitazona sobre <i>la presión arterial y relajación vascular de la descendencia</i>	89
3.3.1	Presión arterial	89
3.3.2	Reactividad vascular en el lecho mesentérico profundo	89

<i>a) Respuesta contráctil a vasoconstrictores no derivados del endotelio</i>	90
Respuesta contráctil a KCl	90
Respuesta contráctil a noradrenalina y angiotensina 2	90
Inhibición de canales de potasio dependientes de voltaje	90
<i>b) Respuesta vasodilatadora del lecho mesentérico</i>	91
Efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora a noradrenalina y posterior vasodilatación con acetilcolina	92
<u>Resumen de los resultados obtenidos</u>	94
<u>CONCLUSIONES</u>	96
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Señalización de la insulina por la vía de las MAP Quinasas (MAP-K)

Tabla 2: Señalización de la insulina por la vía de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K)

Tabla 3: Regiones estructurales y dominios funcionales del receptor PPAR γ .

Tabla 4: Mecanismo de transactivación del PPAR γ .

Tabla 5: Diseño del tratamiento de los animales.

Tabla 6: Contenido de lípidos totales en el tejido adiposo lumbar y en el hígado de las ratas gestantes controles y tratadas con englitazona

Tabla 7: Glucemia e insulinemia durante el test de sobrecarga oral de glucosa en ratas gestantes de 20 días tratadas o no con englitazona.

Tabla 8: Efecto del tratamiento con englitazona sobre los niveles de adiponectina circulante y su expresión en el tejido adiposo de ratas gestantes a día 20 de gestación.

Tabla 9: Efecto del tratamiento con englitazona sobre los niveles de resistina circulante y su expresión en el tejido adiposo en ratas a día 20 de gestación.

Tabla 10: Expresión del receptor de insulina, IRS-2, PI3K, Akt y ERK1-2 en el tejido adiposo de gestantes tratadas con englitazona (EZ) o vehículo (Control).

Tabla 11: Fosforilación del IRS-1 en la serina 307 en el tejido adiposo de madres control y tratadas con englitazona.

Tabla 12: Efecto del tratamiento con englitazona sobre el peso corporal de fetos y neonatos.

Tabla 13: Correlación entre el peso corporal y la concentración de IGF-1 en fetos y neonatos

Tabla 14: Efecto del tratamiento semicrónico con englitazona sobre el peso, contenido lipídico total y contenido de triglicéridos del hígado de los neonatos de un día de vida.

Tabla 15: Efecto del tratamiento con englitazona sobre el peso, contenido lipídico total y contenido de triglicéridos del tejido adiposo marrón de los neonatos de un día de vida.

Tabla 16: Imágenes de microscopía óptica del tejido adiposo marrón de fetos nacidos de madres controles (A y C) y tratadas con englitazona (B y D).

Tabla 17: Efecto del tratamiento con englitazona en la gestación sobre el peso corporal de la descendencia en la edad adulta.

Tabla 18: Fosforilación de la acetilCoA carboxilasa (serina 79) y expresión de resistina tejido adiposo lumbar de hembras de 70 semanas de vida nacidas de madres control y tratadas con englitazona

Tabla 19: Fosforilación de la acetilCoA carboxilasa (serina 79) y expresión de resistina tejido adiposo lumbar de machos de 70 semanas de vida nacidos de madres control y tratadas con englitazona.

Tabla 20: Correlación entre la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa y la expresión de resistina en el tejido adiposo lumbar de las hembras y machos nacidos de madres controles y tratadas con englitazona.

Tabla 21: Curvas de glucosa e insulina durante el OGTT en la semana 8 de vida de las hembras.

Tabla 22: Curvas de glucosa e insulina durante el OGTT en la semana 50 de vida de las hembras.

Tabla 23: Curvas de glucosa e insulina durante el OGTT en la semana 8 de vida de los machos.

Tabla 24: Curvas de glucosa e insulina durante el OGTT en la semana 50 de vida de los machos.

Tabla 25: Expresión de receptor de insulina (A), expresión de la PI₃K (B) expresión del IRS-1 (C) y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-1 (D), expresión del IRS-2 (E) y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-2 (F) en el músculo esquelético de hembras nacidas de madres control y tratadas con englitazona.

Tabla 26: Expresión de la ERK1-2, PDK y PTEN en el músculo de las hembras nacidas de madres control y tratadas con englitazona.

Tabla 27: Expresión de receptor de insulina (A), expresión de la PI₃K (B), expresión del IRS-1 (C) y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-1 (D), expresión del IRS-2 (E) y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-2 (F) en el músculo esquelético de los machos nacidos de madres control y tratadas con englitazona.

Tabla 28: Expresión de la ERK1-2, PDK y PTEN en el músculo de los machos nacidos de madres control y tratadas con englitazona.

Tabla 29: Receptor de insulina, IRS-1, pSer IRS-1, PI₃K y MAPK en el tejido adiposo de las hembras nacidas de ratas gestantes tratadas con vehículo (Control) o englitazona (EZ).

Tabla 30: Expresión de receptor de insulina, expresión y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-1 en el tejido adiposo lumbar de los machos nacidos de madres control y tratadas con englitazona.

Tabla 31: Efecto del tratamiento materno con englitazona sobre la presión arterial de la descendencia a la semana 60 de edad.

Tabla 32: Curvas dosis-respuesta acumuladas de Acetilcolina (A), Acetilcolina en presencia de L-NAME (B) y Nitroprusiato (C) en el lecho mesentérico de las hembras y de Acetilcolina (D), Acetilcolina en presencia de L-NAME (E) y Nitroprusiato (F) en el lecho mesentérico de los machos en la semana 70 de vida.

ÍNDICE DE FIGURAS

Tabla 1: Diferente expresión de los tres subtipos de PPAR en tejidos de roedor adulto

Tabla 2: Características de los anticuerpos primarios y condiciones de incubación en la inmunodetección.

Tabla 3: Características de los anticuerpos secundarios y de la estreptavidina y condiciones de incubación en la inmunodetección.

Tabla 4: Peso corporal de los animales (g).

Tabla 5: Incremento de peso corporal durante los días 16 al 20 de gestación y pesos tisulares.

Tabla 6: Concentraciones en ayunas de glucosa e insulina plasmáticas de las ratas gestantes.

Tabla 7: Efecto del tratamiento con englitazona en las ratas gestantes en las áreas bajo la curva de glucosa e insulina.

Tabla 8: Efecto del tratamiento con englitazona en las ratas gestantes en los índices de sensibilidad a la insulina ISI-OGTT, HOMA-IR, QUICKI y FGIR.

Tabla 9: Efecto del tratamiento con englitazona sobre los lípidos plasmáticos de las ratas gestantes

Tabla 10: Efecto del tratamiento con englitazona en la concentraciones plasmáticas de leptina e IGF-1 en las ratas a día 20 de gestación.

Tabla 11: Efecto del tratamiento con englitazona sobre la leptina e IGF1 plasmáticos de los fetos y los neonatos.

Tabla 12: Efecto del tratamiento con englitazona sobre los parámetros plasmáticos de los fetos y los neonatos.

Tabla 13: Efecto del tratamiento con englitazona sobre el peso corporal.

Tabla 14: Efecto del tratamiento con englitazona sobre el peso del tejido adiposo lumbar, del tejido adiposo marrón y del hígado de las crías en el día 19 de vida.

Tabla 15: Efecto del tratamiento con englitazona de las ratas gestantes sobre la ingesta diaria de las crías durante las semanas 9-12.

Tabla 16: Peso total y peso relativo de los tejidos de los descendientes de madres controles y tratadas con englitazona a las 70 semanas de vida.

Tabla 17: Contenido de lípidos totales del tejido adiposo e hígado de los animales nacidos de madres controles y tratadas a las 70 semanas de edad.

Tabla 18: Efecto del tratamiento con englitazona de las madres sobre los parámetros metabólicos y hormonales de las crías de 19 días de vida.

Tabla 19: Efecto del tratamiento con englitazona en la gestación sobre la glucosa e insulina plasmáticas de sus descendientes.

Tabla 20: Efecto del tratamiento con englitazona sobre la glucosa e insulina plasmáticas en ayunas, HOMA-IR, QUICKI y FGIR de sus descendientes en las semanas 8, 50, 60 y 70 de vida.

Tabla 21: Área bajo la curva de glucosa e insulina, e índice de sensibilidad a la insulina durante el OGTT en las semanas 8 y 50.

Tabla 22: Efecto del tratamiento con englitazona en la gestación sobre los parámetros lipídicos de sus crías a las semanas 11, 17, 22 y 30.

Tabla 23: Efecto del tratamiento con englitazona en la gestación sobre los parámetros lipídicos en ayunas de las crías a las semanas 60 y 70 de vida.

Tabla 24: Respuesta contráctil en el lecho mesentérico profundido en la semana 70 de vida.

LISTADO DE ABREVIATURAS

4-AAP: 4-amino antipirina	Glut-4: transportador de glucosa tipo 4 dependiente de insulina.
4-OHB: ácido 4-hidroxibenzoico	GMPc: guanosina-3',5'-fosfato cíclico
Ach: acetilcolina	GOD: glucosa oxidasa
ADN: ácido desoxirribonucleico	GPO: glicerol fosfato oxidasa
ADRF: factor relajante derivado del adipocito	Grb2: proteína de unión a receptores de factores de crecimiento 2
Akt: proteína quinasa B	GS: glucógeno sintasa
AMPc: Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico	GSK3: glucógeno sintasa quinasa
AMPK quinasa activada por AMP	GSP: glucógeno sintasa fosfatasa
ap2: proteína transportadora de ácidos grasos específica del adipocito	GTP: guanosina 5'trifosfato
ARN: ácido ribonucleico	HMW: alto peso molecular
AUC: área bajo la curva	HOMA-IR: modelo de valoración de homeostasis- resistencia a la insulina
BCA: ácido bicinónico	HRPO: peroxidasa
BMI: Índice de masa corporal	HSL: lipasa sensible a hormonas
BSA: albúmina sérica bovina	IB: inmunoblot
C/EBPs: proteínas de unión a intensificadores de tipo CCAAT	Ig: inmunoglobulina
C: control	IGF: factor de crecimiento similar a la insulina
CoA : coenzima A	IGFBP: proteínas de unión a IGF
DAP: dihidroxiacetona fosfato	IL-6: interleuquina 6
Dominio PH: dominio de unión a pleckstrina	IR: receptor de insulina
Dominio PTB: dominio de unión a fosfotirosina	IRS: sustrato del receptor de insulina
EDHF: factores relajantes derivados de endotelio	ISI: índice de sensibilidad a la insulina
EDTA: ácido etilen diámino tetraacético	JNK: Jun quinasa
EIA: enzima inmunoensayo	kDa: kilodalton
ELISA: enzima linked inmuno sorbent	LMW: bajo peso molecular
Elk: proteína del gen similar a Ets	L-NAME: N ^G -metil-L-argininmetil ester
ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares	LPL: lipoproteína lipasa
ESPA: sodio N-etil-N-(3-sulfopropil)m-anisidina	MAP-K: proteína activada por mitógenos
Ez: englitazona	MEHA: 3-metil-N-etil-n-(β-hidroxietyl)-anilina
FABP: proteína de unión a ácidos grasos	MEK: quinasa de la MAPK/ERK
FATP: proteína transportadora de ácidos grasos	MG: media de glucosa hasta los 60 minutos
FFA: ácidos grasos libres	MI: media de insulina hasta los 60 minutos
FGIR: ratio glucosa insulina en ayunas	mTORC2: complejo mTOR y RICTOR
FPG: glucosa plasmática en ayunas	NA: noradrenalina
FPI: insulina plasmática en ayunas	NADPH: forma reducida de nicotinamida adenina fosfato
G-1-P: glicerol 1-fosfato	NEFA: ácidos grasos no esterificados
GDP: guanosina 5'difosfato	NO: óxido nítrico
GH: hormona del crecimiento	NOS: óxido nítrico sintasa
Glut: transportador de glucosa.	NPS: nitroprusiato sódico

OGTT: test de sobrecarga oral de glucosa
PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno
PDE-III: fosfodiesterasa de AMPc inhibible por GMPc
PKD: quinasa dependiente de fosfatidilinositoles
PEPCK: fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa
PI₃K: fosfatidil inositol 3-quinasa
PKA: proteína quinasa A
PKB: proteína quinasa B
PKC: proteína quinasa C
POD: peroxidasa
PPAR: receptores activados por proliferadores peroxisomales
PPER: elemento respuesta a proliferadores peroxisomales
PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
PVDF: polivinil difluor
QUICKI: índice de chequeo cuantitativo de la sensibilidad a la insulina
Raf: factor activado por Ras
Ras: oncogen de secuencias asociadas a retrovirus

RELM: moléculas similares a la resistina
RNA POL: RNA polimerasa.
RXR: receptor X del ácido retinoico
Ser: serina
SDS: dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SH2: dominio de homología a SRC tipo 2
SH3: dominio de homología a SRC tipo 3
SOS: proteína "son of sevenless"
SREBPs: proteínas de unión a elementos respuesta a esteroides
TAL: tejido adiposo lumbar
TAM: tejido adiposo marrón
TBST: tris-buffer-salino-fosfato
Thr: treonina
TNF: factor de necrosis tumoral
Tyr: tirosina
TZD: tiazolidinediona.
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

INTRODUCCIÓN

1. LA INSULINA Y SU MECANISMO DE ACCIÓN HORMONAL

La insulina es la principal hormona anabólica del organismo, ya que es necesaria para el crecimiento y correcto desarrollo de los tejidos, así como para el adecuado mantenimiento de la homeostasis glucídica. Esta hormona es un polipéptido constituido por dos cadenas de aminoácidos unidas por puentes disulfuro. Es sintetizada en el retículo endoplasmático de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas y secretada después de la ingesta en respuesta a niveles plasmáticos elevados de glucosa y aminoácidos. Además, la insulina también modula de forma importante el metabolismo lipídico, aumentando la síntesis de lípidos en el hígado y en el tejido adiposo y disminuyendo la liberación de NEFA de los triglicéridos del tejido adiposo y del músculo. Por último, la insulina estimula la síntesis de diversos tipos de proteínas, al mismo tiempo que interfiere en sus vías de degradación.

Alteraciones en la secreción de insulina en cualquiera de los dos sentidos pueden producir complicaciones. Así, un aumento en la secreción de insulina produce hipoglucemia, que en caso de ser muy severa puede dar lugar a convulsiones y coma. Por otra parte, la secreción deficiente de insulina puede conducir al desarrollo de diabetes mellitus.

1.1. Cascada de señalización de la insulina

Para que la insulina lleve a cabo sus efectos debe interactuar con su receptor. El receptor de insulina es una proteína transmembrana compuesta por dos subunidades extracelulares α y dos subunidades transmembrana β , unidas por puentes disulfuro. El receptor de insulina se encuentra

presente en la práctica totalidad de los tejidos de los vertebrados aunque su concentración en los diferentes tejidos es muy variable (1). Las subunidades α contienen el dominio de unión a la insulina, mientras que las subunidades β presentan diferentes dominios de fosforilación del receptor y un dominio con función tirosina quinasa. Cuando la insulina no se encuentra unida a la subunidad α del receptor, la actividad tirosina quinasa de la subunidad β se encuentra inhibida (2). Por el contrario, tras la unión de la insulina a la subunidad α , la actividad tirosina quinasa del receptor produce la autofosforilación del propio receptor en residuos de tirosina (3).

Se han descrito diferentes residuos de tirosina en las subunidades β del receptor de insulina que pueden ser autofosforilados tras la unión de la insulina y que se agrupan en 3 regiones funcionales (4). Estas regiones se localizan en la región reguladora extracelular, en el dominio intracelular juxtamembrana y en la región carboxiterminal. La autofosforilación del receptor comienza por la progresiva fosforilación de 3 residuos de tirosina en la región reguladora, lo que produce un aumento de 10-20 veces en la actividad tirosina quinasa del receptor (5).

El dominio juxtamembrana interacciona con mayor afinidad con los sustratos del receptor de insulina (IRS; *insulin receptor substrates*) cuando no se encuentran fosforilados. Una vez que estos sustratos son fosforilados, se produce una disminución de su afinidad y se traslocan a una región subcelular lo cual permite la propagación de la señal al interior de la célula (6).

Por último, la región carboxilo-terminal del receptor de insulina interacciona con la proteína Shc, que interviene en otra de las vías de la transducción de la señal de la

insulina (7). Sin embargo, esta región no parece jugar un papel crítico ya que los mutantes del receptor de insulina que carecen de la región carboxilo terminal no presentan deficiencias en la transducción de la señal (8), por lo que esta región debe tener una función complementaria.

Además de la autofosforilación en tirosinas, la insulina también promueve la fosforilación en residuos de serina y treonina del receptor de insulina, inhibiendo de este modo la actividad tirosina quinasa dependiente de insulina del receptor (9). Esto resulta en la disociación de los sustratos del receptor de insulina del receptor y en la disminución de la transducción de la señal al interior celular (10). Sin embargo, esta fosforilación en serinas y treoninas tiene lugar más lentamente que la fosforilación en los residuos de tirosina, por lo que parece ser un mecanismo de regulación a la baja de la señalización (11).

Como se ha comentado anteriormente, para que la propagación de la señal tenga lugar, además de producir su propia fosforilación, el receptor de insulina debe fosforilar a los sustratos del receptor de insulina (IRS) (12). Los IRSs son un conjunto de proteínas de anclaje que actúan como intermediarios entre el receptor de insulina y el complejo entramado de moléculas intracelulares de señalización. El primer sustrato del receptor de insulina fue descrito en 1985 por White et al. (13), y se denominó IRS-1. En la actualidad se conocen otros miembros de esta familia que presentan diferentes funciones. El IRS-1 es el principal responsable del anclaje y activación de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI₃K), mientras que el IRS-2 requiere de concentraciones superiores de insulina para producir un efecto similar (14). Por el contrario, el IRS-3 y el IRS-4 parecen impedir la

transducción de señales mediadas por el IRS-1 y el IRS-2 (15).

Tanto el IRS-1 como el IRS-2, son proteínas cuya región amino terminal se encuentra altamente conservada y contienen un dominio de homología a pleckstrina (*pleckstrin-homology domain*) con capacidad para unirse a los fosfolípidos de la membrana (16). Asimismo existe otro dominio de unión a fosfotirosina (*phosphotyrosine binding domain*) cuyos sitios de unión están situados en la región más próxima a la membrana del receptor de insulina (17). En la región carboxilo terminal se sitúa un dominio con gran cantidad de tirosinas que pueden ser fosforiladas y servir de sitio de anclaje para otras proteínas como la PI₃K, Grb2, Nck, Crk, Fyn o SHP-2, que median las acciones de la insulina sobre el metabolismo y el crecimiento (18-23).

Por otra parte, al igual que se ha descrito para el receptor de insulina, el IRS-1 y el IRS-2 presentan unos 30 sitios consenso de fosforilación en serina y treonina (Ser/Thr). La fosforilación en estos residuos de serina y treonina reduce la capacidad de los IRS de interactuar con el receptor de insulina y de propagar la señal al interior celular, por lo que dicha fosforilación se ha propuesto como un posible mecanismo de regulación negativa y como mecanismo implicado en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

La señalización del receptor de insulina incluye dos vías principales: a) la vía de la fosfatidil inositol 3-quinasa o PI₃K, b) y la vía de la quinasa de la proteína activada por mitógenos o MAP-quinasas (MAPK).

1.1.1. Vía de la fosfatidil inositol 3-quinasa

La PI₃K (**figura 1**) es una quinasa de fosfoinositoles. Está compuesta por dos subunidades: la subunidad p85 o reguladora y la subunidad p110 o catalítica. La subunidad p85 está compuesta por un dominio amino terminal con homología a Src de tipo III (SH3), dos dominios con homología a Src de tipo II (SH2) por los que se asocia a los residuos fosfotirosina de los IRS y un tercer dominio SH2 por el que se asocia a la subunidad catalítica p110 (24;25).

Tras la activación del receptor de insulina, el IRS-1 es fosforilado en tirosinas. Una vez fosforilado, el IRS-1 se libera del receptor de insulina y es reclutado a una región intracelular en la que interactúa con la PI₃K. La activación de la PI₃K se debe a la interacción del dominio SH2 de la subunidad reguladora con los IRS fosforilados, lo que conlleva la aproximación de la PI₃K a los fosfoinositoles de la membrana celular. Esta relocalización permite que la subunidad p110 activada genere fosfoinositoles mono, bis y tris-fosfato (26). De esta forma, el IRS-1 y la PI₃K actúan como nexos de unión entre el receptor de insulina y algunas de las proteínas que regulan el metabolismo de la glucosa como son los transportadores de glucosa y las proteínas implicadas en la síntesis de glucógeno (27).

Tras la activación de la PI₃K se produce el reclutamiento a la cara interna de la membrana celular de proteínas con dominios de unión a pleckstrina, entre las que se encuentra la Akt. La activación de esta serina treonina quinasa, también conocida como proteína quinasa B (PKB), se debe a un mecanismo dual. En primer lugar, es necesario el reclutamiento de la Akt a la membrana plasmática y la interacción de su dominio PH con los PIP₃, lo cual produce un cambio

conformacional en su estructura. Este cambio conformacional es necesario para su fosforilación en la Thr-308 por las proteínas quinasa dependientes de 3-fosfatidilinositoles (PDK1-2) (28;29). A continuación, tiene lugar una segunda fosforilación en la Ser-473 por medio de un complejo conocido como mTORC2 formado por la proteína quinasa mTOR (proteína diana molecular para rapamicina) y su subunidad reguladora conocida como RICTOR. EL complejo mTORC2 es activado por un mecanismo dependiente de PIP₃, que hasta el momento no se conoce en su totalidad (30).

La activación de la Akt conduce a la propagación de múltiples señales celulares, incluyendo la de la insulina y diversas señales de supervivencia celular. En lo que hace referencia a la señalización de la insulina, se ha descrito un papel importante de la Akt como mediador del transporte de glucosa inducido por insulina en tejido adiposo y músculo, y como regulador de la síntesis de glucógeno a través de la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), activando por tanto la glucógeno sintasa (31) y la síntesis de glucógeno (**figura 1**).

El transportador de glucosa dependiente de insulina (GLUT-4) está directamente implicado en el mantenimiento de la homeostasis metabólica y en la captación de glucosa dependiente de insulina. El GLUT-4 en el estado basal se encuentra mayoritariamente en unas vesículas intracelulares) mientras que tras la estimulación con insulina es reclutado a la membrana plasmática por un proceso de exocitosis (**figura 1**) (32). Cuando la señal se ha mitigado, rápidamente el GLUT-4 es de nuevo recaptado de la superficie celular mediante un proceso de endocitosis, sobre el que la insulina no tiene ningún efecto (32).

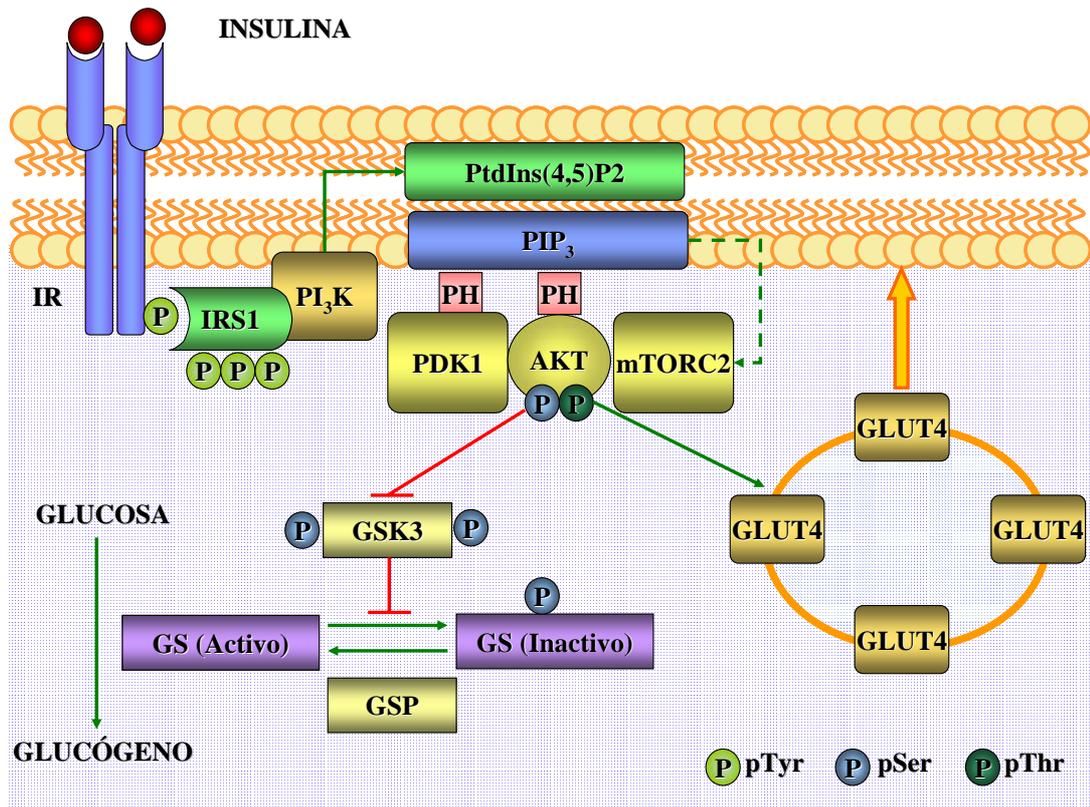


Figura 1: Señalización de la insulina por la vía de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI₃K): IR: receptor de insulina; IRS: sustrato del receptor de insulina; PI₃K: fosfatidil inositol 3-quinasa; PDK: quinasa dependiente de fosfatidilinositoles; mTORC2: complejo mTOR y RICTOR; Akt: proteína quinasa B; GSK3: glucógeno sintasa quinasa; GS: glucógeno sintasa; GSP: glucógeno sintasa fosfatasa; Glut-4: transportador de glucosa tipo 4 dependiente de insulina.

Es bien conocido que la PI₃K media la captación de glucosa dependiente de insulina. Por un lado, la wortmanina, un inhibidor de la PI₃K, inhibe la estimulación dependiente de insulina de la actividad PI₃K, así como la translocación del GLUT-4 a la membrana plasmática (33). Por otro lado, si el tratamiento con wortmanina se combina con formas solubles de fosfoinositoles tris-fosfato, productos finales de la activación de la PI₃K, no se observan los efectos inhibitorios de la wortmanina sobre el transporte de glucosa dependiente de insulina. Todos estos resultados evidencian un papel clave de la PI₃K en la modulación del transporte de glucosa por GLUT-4 (34). Asimismo, se ha descrito que la activación de la Akt es un mecanismo indispensable para la

translocación del GLUT-4, tanto en células adiposas como musculares (31;35-37).

En lo que respecta a la síntesis de glucógeno, la activación de la Akt produce la fosforilación de la glucógeno sintasa quinasa-3 en la Ser-21 de la subunidad α y en la Ser-9 de su subunidad β . Estas modificaciones disminuyen la actividad de la GSK3 y promueven la desfosforilación y activación de la glucógeno sintasa por medio de la glucógeno sintasa fosfatasa. Esta activación de la glucógeno sintasa junto con el aumento en la captación de glucosa mediado por GLUT-4 promueven el aumento en la conversión de la glucosa en glucógeno en el músculo esquelético.

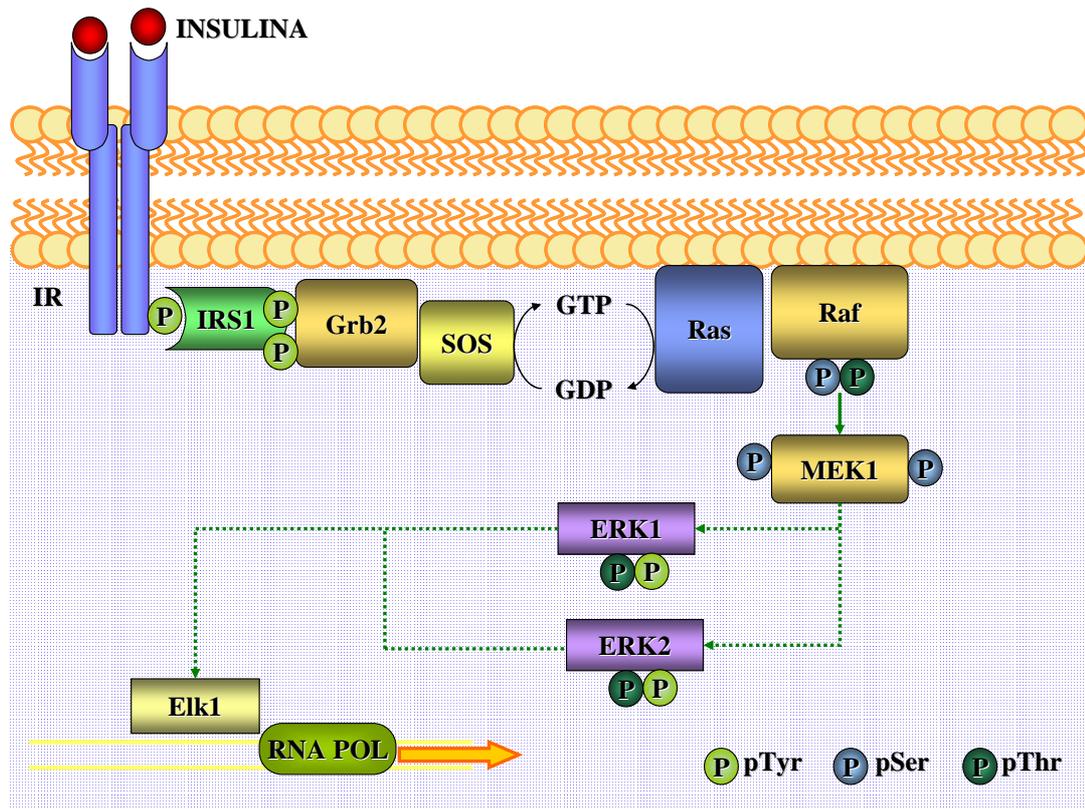


Figura 2: Señalización de la insulina por la vía de las MAP Quinasas (MAPK): IR: receptor de insulina; IRS: sustratos del receptor de insulina; Grb2: proteína de unión a receptores de factores de crecimiento 2; SOS: proteína "son of sevenless"; MEK: quinasa de la MAPK/ERK; Ras: oncogen de secuencias asociadas a retrovirus; Raf: factor activado por Ras; ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares; Elk: proteína del gen similar a Ets (*Ets-like gene 1*); RNA POL: RNA polimerasa.

1.1.2. Vía de las MAP quinasas (MAPK)

La vía de la MAPK se inicia por la unión de Grb2, a través de su dominio SH2, a las tirosinas fosforiladas de los IRS. En mamíferos, Grb2 se encuentra preunido a mSOS, proteína que cataliza el intercambio de nucleótidos GDP y GTP en Ras (oncogen de secuencias asociadas a retrovirus), una proteína G con actividad GTPasa. La activación de Ras conduce a su acoplamiento con la región amino terminal de Raf (factor activado por Ras), la traslocación de Raf a la membrana y la fosforilación de Raf por serina-treonina quinasas, activándola. (38). A continuación, Raf con actividad serina quinasas, activa por fosforilación de dos residuos de serina a MEK1 (quinasa de la MAPK/ERK),

una quinasa con especificidad dual que fosforila las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK-1 (p42 MAPK) y ERK-2 (p44 MAPK) en residuos de tirosina y treonina (39). Finalmente las ERKs (quinasas reguladas por señales extracelulares), proteínas de la familia de las MAPK, van a mediar la fosforilación de factores de transcripción como Elk-1 (proteína del gen similar a Ets) e inducen la transcripción de genes que codifican por proteínas implicadas en las funciones fisiológicas de la insulina. Aunque estas dos vías de señalización de la insulina se han descrito de un modo lineal, cada una de ellas puede interaccionar con la otra. Así, se ha descrito que la Akt puede activar a Raf y a su vez Ras puede activar a la PI_3K .

1.2. Funciones fisiológicas de la insulina

A continuación se resumen algunos de los aspectos más relevantes de los efectos fisiológicos de la insulina:

1.2.1. Estimulación del transporte de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina

Existen distintas proteínas transportadoras de glucosa que difieren en sus propiedades y distribución. Entre ellos, destaca el transportador de glucosa dependiente de insulina (GLUT-4), que se expresa fundamentalmente en el músculo esquelético y el tejido adiposo, en los que el transporte de glucosa está mediado por insulina. Los mecanismos de señalización insulínica que median el transporte de glucosa y la traslocación del GLUT-4 desde compartimentos intracelulares a la membrana no son en su totalidad conocidos, aunque diferentes líneas de investigación indican que la activación de la PI₃K es necesaria para la traslocación por exocitosis del transportador de glucosa sensible a la insulina, GLUT-4 (40-42). Por otro lado, se sabe que tras ser estimulada por la insulina, la Akt es capaz de regular la captación de glucosa y la traslocación de GLUT-4 a la membrana plasmática en adipocitos aislados de rata, en células 3T3-L1 y en células musculares L6 (31;35-37).

1.2.2. Regulación sobre el metabolismo del glucógeno hepático

La insulina determina el paso del hígado de ser un órgano productor de glucosa a un órgano captador de glucosa, ya que en el hígado la insulina activa la síntesis de glucógeno e inhibe la gluconeogénesis. De

esta forma, la insulina facilita la síntesis neta de glucógeno, actuando sobre las enzimas que en ella participan, impidiendo el aumento de AMPc provocado por el glucagón y las catecolaminas, lo cual modera los niveles hepáticos de AMPc.

Así, su acción activadora de la glucógeno sintasa e inactivadora de la glucógeno fosforilasa en hígado *in vivo* parece explicarse por una disminución de los niveles de AMPc. La glucógeno sintasa es una enzima regulada por fosforilación y por efectores alostéricos (43). De hecho, la fosforilación de la glucógeno sintasa conduce a su inactivación (**figura 1**). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el tratamiento con insulina promueve el paso de la glucógeno sintasa de una forma fosforilada poco activa y que depende de la glucosa-6-fosfato para ser activa, a una forma defosforilada muy activa e independiente de la glucosa-6-fosfato. Como se ha detallado anteriormente, esta defosforilación se debe al menos en parte a la fosforilación e inhibición de la glucógeno sintasa quinasa (GSK-3), que parece ser mediada por insulina a través de la vía IRS-PI₃K- Akt (43-45).

1.2.3. Gluconeogénesis

El papel de la insulina sobre la gluconeogénesis se debe fundamentalmente a que esta hormona disminuye la disponibilidad de sustratos gluconeogénicos. Por una parte, inhibe la salida de aminoácidos del músculo a través de sus efectos sobre la síntesis de proteínas y la proteólisis. Por otra, disminuye también la salida de glicerol del tejido adiposo, como consecuencia de su acción antilipolítica. Además, la insulina inhibe a determinadas enzimas que catalizan reacciones en la gluconeogénesis y estimula las de la glucólisis, a través de mecanismos dependientes de la síntesis de proteínas. La acción a corto plazo

de la insulina sobre la gluconeogénesis es poco conocida. Sin embargo, esta hormona inhibe la gluconeogénesis previamente estimulada por glucagón. Esto se debe, a que la insulina estimula la actividad fosfodiesterasa, lo cual provoca la disminución de los niveles de AMPc aumentados previamente por el glucagón. Sin embargo, en ausencia de pre-estimulación, la insulina no parece modificar la actividad gluconeogénica a corto plazo (46;47).

1.2.4. Efecto de la insulina en la lipogénesis

La insulina es un factor hormonal clave en el control de la lipogénesis hepática, sobre la que parece influir tanto a corto, como a largo plazo (48;49). Por otra parte, en el tejido adiposo la insulina estimula la síntesis de ácidos grasos y su esterificación, e inhibe su oxidación y la cetogénesis (49-51).

El papel de la insulina activando la lipogénesis parece tener lugar a distintos niveles: en primer lugar y como se ha descrito anteriormente, la insulina no solo aumenta la disponibilidad intracelular de glucosa sino también de los sustratos de la lipogénesis, mediante la activación de la piruvato deshidrogenasa (52), potenciando así la formación de citrato que es utilizado como sustrato en la lipogénesis (53). Además, la insulina estimula la vía de las pentosas monofosfato, lo cual contribuye al suministro del NADPH requerido para la lipogénesis. Por otro lado, la insulina, de manera opuesta al glucagón, puede estimular la desfosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (54) la cual una vez activada, aumenta los niveles intracelulares de malonil-CoA y la velocidad de la lipogénesis (55).

Por último, se sabe que la insulina incrementa los niveles de glicerol-3-fosfato necesario para

la formación de triglicéridos y fosfolípidos y estimula la incorporación de ácidos grasos a triglicéridos (49) evitando así la inhibición de los acilCoA, por retroalimentación negativa, de la lipogénesis.

1.2.5. Mecanismo de acción antilipolítico de la insulina

La insulina es la principal hormona antilipolítica del organismo tanto a corto, como a largo plazo, a través de diferentes mecanismos. Los efectos de la insulina sobre la cascada lipolítica a corto plazo difieren de los efectos que provoca una continuada exposición de los adipocitos a dicha hormona (56).

En cuanto a los efectos inmediatos, la insulina provoca: i) la desfosforilación de la lipasa sensible a las hormonas (HSL), y por lo tanto su inhibición, mediante la activación de una proteína fosfatasa, y ii) la activación de la fosfodiesterasa de AMPc inhibible por GMPC (PDE-III), que produce la disminución en la concentración de AMPc al catalizar su transformación a 5'AMP, el cual no posee actividad como segundo mensajero (57).

En lo referente a los efectos a largo plazo, una continuada exposición a la insulina provoca la internalización o secuestro de los receptores β -adrenérgicos (58). A su vez, se ha descrito que la insulina ejerce un potente efecto inhibitorio en la transcripción del gen del receptor β_3 -adrenérgico, sin afectar a la expresión de los receptores β_1 , y β_2 -adrenérgicos (59).

2. RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina es una alteración hormonal que se define como “la inhabilidad de las células o tejidos de responder a concentraciones fisiológicas de insulina” (60;61). Dicha resistencia puede manifestarse, bien como una disminuida sensibilidad a los efectos de la hormona, siendo necesario un incremento en la concentración de la insulina necesaria para alcanzar la mitad del efecto máximo, bien como una disminución en la respuesta máxima alcanzada por la insulina, o ambas. Está asociada al envejecimiento y a los estilos de vida sedentarios y además existe cierta predisposición genética (62). La resistencia a la insulina es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2, especialmente si se encuentra asociada a sobrepeso (63).

En los pacientes con resistencia a la insulina se produce un aumento en la secreción de insulina por las células beta para compensar la disminuida sensibilidad a los efectos de la hormona. Como consecuencia se produce hiperinsulinemia, que en etapas tempranas es suficiente para mantener la glucemia entorno a niveles normales. En los pacientes que desarrollarán diabetes mellitus tipo 2 se produce una disfunción de las células β y, como consecuencia, una insuficiencia insulínica relativa o absoluta que no puede compensar la glucemia, una intolerancia a la glucosa y, en definitiva, diabetes (64).

Sin embargo, la resistencia a la insulina no siempre se encuentra asociada a diabetes mellitus tipo 2. En algunos pacientes que presentan resistencia a la insulina, la secreción de insulina y la glucemia es normal y aunque requieren de una mayor secreción de insulina para mantener la normoglicemia nunca llegan a desarrollar diabetes tipo 2.

Asimismo, durante la edad avanzada y en algunas situaciones patológicas, como la obesidad, el síndrome del ovario poliquístico y el síndrome X, se puede producir una resistencia a la insulina, que no tiene porqué desencadenar en diabetes tipo 2 mientras no se produzca una disfunción de las células beta (65). Por último, cabe destacar que la resistencia a la insulina puede ser consecuencia de una situación fisiológica, como es el caso de la gestación.

A nivel molecular, los pacientes con resistencia a la insulina se caracterizan por presentar alteraciones en la fosforilación de los IRS, la actividad de la PI3K y/o la actividad del GLUT-4 (66). Aunque el origen de estas alteraciones no ha sido clarificado aun en su totalidad, la mayoría de los estudios coinciden en que tanto los NEFA, como algunos factores expresados y/o secretados por el adipocito, parecen jugar un importante papel en la patogénesis de la resistencia a la insulina (67).

2.1. Implicación del tejido adiposo en el desarrollo de la resistencia a la insulina

Estudios recientes han permitido redefinir las funciones del tejido adiposo, pasando de un mero tejido de almacenamiento de energía, a un órgano con alta capacidad metabólica y endocrina (68). Hace tan solo 20 años, se descubrió que el tejido adiposo tiene capacidad de metabolizar las hormonas sexuales (69). Su capacidad endocrina fue corroborada en 1994 tras la identificación y caracterización de la leptina en este tejido (70). Actualmente se sabe que los diferentes tipos celulares que componen el tejido adiposo son capaces de secretar diversos factores hormonales (71). Los preadipocitos secretan factores implicados en su propia

diferenciación, mientras que los adipocitos secretan proteínas con funciones autocrina, paracrina y endocrina. Por otro lado, el tejido adiposo expresa a su vez un gran número de receptores tanto para péptidos de sistemas hormonales clásicos, como para hormonas secretadas por el sistema nervioso central. Recientemente, se ha descubierto que los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo también pueden secretar diferentes proteínas que también pueden afectar la homeostasis metabólica (72).

Así, además de los ácidos grasos libres (NEFA, el tejido adiposo secreta un grupo de sustancias denominadas genéricamente adipoquinas. De esta forma, el tejido adiposo presenta una estrecha comunicación con diferentes órganos y tejidos e interviene en la regulación de diferentes procesos regulando el metabolismo, la respuesta inmune y presenta funciones neuroendocrinas y vasculares (73-75). Cabe destacar que desde el descubrimiento de su papel endocrino, se ha atribuido a este tejido un importante papel en la patogénesis de la resistencia a la insulina (76).

2.1.1. Ácidos grasos libres y resistencia a la insulina.

El tejido adiposo es capaz de regular, mediante fenómenos de captación y liberación, la concentración de NEFA plasmáticos. Existen importantes evidencias de que los NEFA están implicados en el desarrollo de la resistencia a la insulina tanto en animales como en humanos (77-79). Así por ejemplo, algunos autores han demostrado que un aumento en la concentración plasmática de NEFA mediante infusión continua de una solución de lípidos puede producir alteraciones en la captación de glucosa estimulada por insulina (80). Por el contrario, una disminución

en los niveles plasmáticos de NEFA aumenta la captación y utilización de glucosa estimulada por insulina (81).

Para intentar explicar la implicación de los NEFA en el desarrollo de la resistencia a la insulina se han propuesto diferentes hipótesis (82). La primera de ellas enunciada por Randle et al y conocida como el "ciclo de Randle" (83), propone que se establece una competición por la oxidación mitocondrial entre los NEFA y la glucosa. Según esta hipótesis, un aumento en la concentración de NEFA en plasma induce un aumento en la actividad de la proteína transportadora de ácidos grasos 1 (translocasa), un aumento en la captación de NEFA por las células musculares y en definitiva un aumento en su concentración intracelular. La oxidación de estos NEFA en las mitocondrias aumenta las relaciones intramitocondriales de acetil-CoA/CoA y NADH/NAD⁺, lo cual resultaría en una rápida inactivación de la piruvato deshidrogenasa, en una acumulación de citrato en el interior celular y en el enlentecimiento de la glucólisis. Como consecuencia final se produciría una disminución en la entrada de glucosa al interior celular. Este ciclo permitiría explicar el efecto contrapuesto de los NEFA a la acción de la insulina (84).

Sin embargo, diferentes grupos de investigación han obtenido evidencias en contra de esta hipótesis. La hipótesis alternativa propone que la reducción en la captación de glucosa por el músculo por efecto de los NEFA está precedida de una disminución en los niveles intracelulares de glucosa-6-fosfato, lo cual estaría en contra de lo propuesto por Randle. Esta hipótesis propone que la disminución en la captación de glucosa observada en pacientes con resistencia a la insulina es debida a una inhibición de la actividad del transportador de

glucosa y no a una inactivación del complejo de la piruvato deshidrogenasa (85). Esta hipótesis alternativa está en consonancia con el hecho de que la concentración de glucosa-6-fosfato es baja en los individuos diabéticos y que la fosforilación y el transporte de glucosa están disminuidos en los individuos con resistencia a la insulina (86). En consonancia con esta hipótesis, se ha propuesto que las reducciones en las tasas de oxidación de glucosa y de síntesis de glucógeno son secundarias a la disminución en el transporte de glucosa (87).

Más recientemente, se ha postulado que la resistencia a la insulina inducida por los NEFA es consecuencia de alteraciones en la transducción de la señal insulínica al interior celular (88). Así, los elevados niveles de NEFA en plasma producen una acumulación de algunos de sus metabolitos como el diacilglicerol, los acil-CoAs y la ceramida en las células. Estos metabolitos aumentan la expresión y/o actividad de la proteína quinasa C teta (PKC ξ) la cual activa una cascada de serina-treonina quinasas que finalmente son capaces de fosforilar al IRS-1 en residuos de serina (Ser-307, Ser-318). Esta fosforilación en serinas impide la fosforilación del IRS-1 en residuos de tirosina (89) y su asociación con la PI₃K (90). Como consecuencia final se produce una disminución en la disponibilidad del transportador de glucosa en la membrana plasmática (91), y una disminución en la captación y utilización de la glucosa por el músculo esquelético y el tejido adiposo, lo cual es característico de las patologías que cursan con resistencia a la insulina.

2.1.2. Adipoquinas y resistencia a la insulina

Entre las moléculas secretadas por el tejido adiposo, además de los NEFA, se encuentra un grupo de sustancias, denominadas genéricamente adipoquinas, entre las que se encuentran moléculas implicadas en la regulación del peso corporal (leptina), sustancias relacionadas con el sistema inmune (TNF- α , IL-1, IL-6), relacionadas con la función vascular (angiotensina e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)), con cambios en la sensibilidad a la insulina (resistina, adiponectina) y con la función reproductora, entre otras. Por estas razones, además del papel clásico de almacenamiento de energía, el tejido adiposo interviene en la regulación de diferentes procesos metabólicos, regula la respuesta inmune y presenta funciones neuroendocrinas y vasculares (92;93) y presenta un importante papel en la patogénesis de la resistencia a la insulina (94;95).

a) Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)

El TNF- α fue inicialmente descrito como un factor que causaba la necrosis de los tumores. Actualmente, es conocido que este factor es secretado por el tejido adiposo y existen cada vez más evidencias que apoyan que el TNF- α está implicado en el desarrollo de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad (96). En el tejido adiposo de individuos obesos, la expresión de TNF- α es superior que en individuos normales (97), y se ha observado una fuerte correlación positiva entre los niveles del ARNm de TNF- α en el tejido adiposo y el grado de hiperinsulinemia (98). Otros autores han descrito que el tratamiento con TNF- α induce un estado de resistencia a la insulina, caracterizado por una disminución

en la supresión de la producción hepática de glucosa y una disminución en la captación de glucosa tras la estimulación con insulina (99). Se han propuesto diferentes mecanismos por los que el TNF- α puede inducir el desarrollo de la resistencia a la insulina (100). En primer lugar, el TNF- α puede bloquear la señalización de la insulina mediante cambios en la fosforilación de proteínas de la cascada de señalización de la insulina tales como el receptor de insulina y los sustratos del receptor de insulina (101).

Por otro lado, el TNF- α es capaz de disminuir la expresión de algunas de las proteínas (IRS, GLUT-4) implicadas en la cascada de transducción de señales de la insulina (102). Asimismo, se ha descrito que el TNF- α aumenta los niveles de NEFA circulantes, los cuales, como se ha comentado anteriormente, están muy relacionados con la resistencia a la insulina tanto en estadios iniciales de la diabetes como en etapas más avanzadas (103).

b) Leptina

La leptina es un polipéptido de 16 kDa que presenta similitud estructural con algunas citoquinas. Es secretada principalmente por los adipocitos, en particular fundamentalmente por el tejido adiposo subcutáneo más que del tejido adiposo visceral y sus niveles plasmáticos son un reflejo del estado nutricional y del contenido de tejido adiposo del individuo (104;105). La leptina ejerce sus efectos sobre la homeostasis metabólica tanto en el sistema nervioso central (hipotálamo), en donde regula la ingesta y el gasto energético (106), como en los tejidos periféricos (músculo y células β pancreáticas) (107).

En lo que respecta a la señalización de la insulina, se ha propuesto que la leptina tiene un efecto bifásico sobre la sensibilidad a la

insulina, siendo sus efectos dependientes de su concentración (108). Así, se ha demostrado que tanto la hiperleptinemia, como la deficiencia en leptina pueden conducir al desarrollo de resistencia a la insulina. En primer lugar, se ha demostrado que la infusión continua de dosis bajas de leptina recombinante mejora la sensibilidad a la insulina y la disponibilidad de glucosa (109), debido a que la leptina promueve la captación de NEFA por parte del tejido adiposo (110). Sin embargo, el tratamiento crónico con leptina puede alterar la respuesta a la insulina especialmente en el tejido adiposo (111). En este sentido, concentraciones suprafisiológicas de leptina, disminuyen la fosforilación en tirosinas del receptor de insulina y alteran la activación de varias de las proteínas finales de la señalización de la insulina como las MAPK y la glucógeno sintasa quinasa (112).

c) Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)

El inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) es un inhibidor de serina proteasas que actúa inhibiendo la fibrinólisis intravascular (113). Su ARNm se expresa tanto en el tejido adiposo subcutáneo como en el visceral (114) y su expresión aumenta en el tejido adiposo visceral durante la progresión de la obesidad y la resistencia a la insulina.

El PAI-1 altera la señalización de la insulina impidiendo la cooperación de las integrinas con el receptor de insulina, y sus niveles pueden utilizarse con valor pronóstico de mortalidad y morbilidad por enfermedades coronarias en pacientes diabéticos (115).

d) Interleuquina-6

La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina proinflamatoria secretada por el tejido adiposo subcutáneo, que puede participar en la patogénesis de la resistencia a la insulina asociada a obesidad en humanos (116). Los principales efectos de la IL-6 consisten en una disminución de la fosforilación en tirosinas del IRS-1, una disminución en la asociación del IRS-1 con la PI₃K y la consecuente disminución en la fosforilación de la Akt (117). Asimismo, se ha descrito que la IL-6 reduce la actividad lipoproteína lipasa en el tejido adiposo de ratones y en adipocitos 3T3-L1, que es la enzima limitante de la hidrólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos (118).

e) Resistina

La resistina es una adipoquina de 12 kDa, que fue identificada en un estudio de los genes que se inducían durante la diferenciación del adipocito (119). Es una hormona de la familia RELM (moléculas similares a la resistina). Todos los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de 10 residuos conservados de cisteína, aunque la resistina y la RELM-β presentan un residuo de cisteína adicional en la región amino terminal, que es necesario y suficiente para la homodimerización (120). Además de homodimerizar, la resistina puede formar complejos multiproteicos mediante la formación de heterodímeros con otros miembros de la familia RELM (121). El análisis de la estructura cristalizada revela la presencia de dos estados de ensamblaje, que consisten en trímeros y en hexámeros formados a su vez por trímeros unidos por puentes disulfuro en su extremo amino terminal (122).

Según los estudios de Stepan y colaboradores realizados en roedores, la resistina esta presente en el suero y sus

niveles se encuentran aumentados en la obesidad. La administración exógena de resistina recombinante altera la captación de glucosa mediada por insulina en ratones normales, mientras que la inmunoneutralización con anticuerpos anti-resistina aumenta la sensibilidad a la insulina en ratones obesos y con resistencia a la insulina. Por otro lado, estos autores observaron una disminución en la expresión de resistina tras el tratamiento con rosiglitazona, una tiazolidinediona utilizada para el tratamiento de la resistencia a la insulina. A la vista de estos resultados, los autores concluyeron que la resistina podría ser el eslabón entre la obesidad y la diabetes tipo 2 (119).

Otros autores han observado que la exposición de ratones a una dieta rica en grasas induce el desarrollo de resistencia a la insulina y de un aumento del 80% de los niveles de resistina en plasma (123). La inmunoneutralización con anticuerpos anti-resistina en estos ratones normalizó nuevamente los niveles plasmáticos de resistina y revirtió la resistencia a la insulina hepática (124). Finalmente, se ha propuesto que los efectos de la resistina sobre la resistencia a la insulina son debidos a la activación de la glucosa-6-fosfatasa, que impide la síntesis de glucógeno y aumenta la tasa de producción de glucosa (125).

Sin embargo, resultados de estudios recientes están en contra de este papel de la resistina como nexo de unión entre la obesidad y la resistencia a la insulina. En primer lugar, se ha observado una disminución de los niveles de ARNm de resistina en el tejido adiposo en diferentes modelos de obesidad (126;127). Por otro lado, no se ha observado una disminución de la expresión de resistina o algún tipo de correlación en diferentes modelos de resistencia a la insulina en roedores (128) o en

humanos (129). Por último, el papel de esta proteína en la maduración del adipocito tampoco está claro, ya que algunos estudios muestran que la resistina es capaz de inhibir la diferenciación del preadipocito (130), y otros han observado una disminución de la expresión de dicha adipoquina durante la diferenciación de preadipocitos humanos (131).

f) Adiponectina

La adiponectina fue identificada por diferentes métodos e independientemente por cuatro grupos de investigación que la denominaron apM1, acrp30, adipoQ y GBP28 (132). Esta proteína es sintetizada por los adipocitos maduros y sus niveles plasmáticos (133-135) son muy elevados cuando se comparan con los de otras adipoquinas (136). La adiponectina es una proteína de 30 kDa que contiene una cola de colágeno en el dominio amino terminal y una cabeza globular en el dominio C terminal (132-134;137).

El monómero de adiponectina solamente ha sido detectado en el adipocito y no en circulación. Una vez sintetizados, los monómeros trimerizan a través de interacciones muy estrechas entre sus colas de colágeno. Estos homotrímeros pueden ensamblarse en estructuras poliméricas superiores, dando lugar a complejos de alto peso molecular (138). La adiponectina está presente en el plasma de dos formas: como un hexámero de bajo peso molecular (LMW) o como complejos de alto peso molecular que engloban de 12 a 18 monómeros (HMW) (139;140). Finalmente, para que la adiponectina pueda ejercer su actividad biológica es necesario que tengan lugar una serie de modificaciones postraduccionales, como hidroxilaciones y glicosilaciones (138;141).

Aunque la adiponectina es secretada por el adipocito maduro, los niveles séricos de adiponectina no aumentan con la obesidad como ocurre con la leptina o el TNF- α (142-144), sino que se encuentran disminuidos en el tejido adiposo de ratones y humanos obesos. De hecho, se ha propuesto que los elevados niveles de TNF- α y de otras citoquinas que son expresadas por el tejido adiposo de individuos obesos son responsables, al menos en parte, de la disminución de los niveles de adiponectina que se observan en la obesidad (145).

Otro factor que podría jugar un papel muy importante en la disminución de los niveles de adiponectina es la hiperinsulinemia. Así, se ha observado que la infusión de insulina en los anclajes euglucémicos hiperinsulinémicos conducen a una disminución de la producción y secreción de la adiponectina por los adipocitos (146). Por último, se ha propuesto que la secreción de adiponectina por los adipocitos 3T3L1 está mediada por la PI₃K (147). Así, la disminución en la activación de la PI₃K en los pacientes diabéticos podría ser responsable de la disminución de los niveles de adiponectina en suero (148).

Diferentes tipos de evidencias sugieren que la adiponectina favorece la sensibilidad a la insulina. En primer lugar, los niveles séricos de adiponectina se correlacionan con la captación de glucosa mediada por insulina (149) y con la sensibilidad a la insulina, tanto *in vivo* como *in vitro* (150), por lo que se han propuesto como índice de la sensibilidad a la insulina en los pacientes que presentan diabetes tipo 2 (151). Asimismo, la administración exógena de adiponectina reduce los niveles de glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina mediante la supresión de la salida hepática de glucosa en modelos de diabetes tipo 1 y 2 en ratones (152), y disminuyendo la producción hepática

de glucosa a través de la disminución de la expresión de fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa (153). Por otro lado, los niveles de adiponectina se encuentran disminuidos en diferentes patologías que cursan con resistencia a la insulina como son la obesidad, la diabetes y las lipodistrofias (142;154) y el tratamiento con adiponectina globular recombinante de estas patologías produce una disminución de la hiperglucemia e hiperinsulinemia y una mejora de la sensibilidad a la insulina (150). Finalmente, el tratamiento agudo con la fracción funcional de la adiponectina es capaz de disminuir los elevados niveles de NEFA tras la administración de una dieta grasa o una infusión constante de lípidos (155). Este efecto parece ser consecuencia de un aumento de la oxidación de los NEFA en el músculo esquelético y contribuiría a la mejora en la sensibilidad a la insulina (101;156;157).

g) Interacciones entre las adipoquinas

Además de sus funciones individuales, estas adipoquinas han demostrado interactuar entre sí. Así, se ha descrito una correlación negativa entre los niveles de adiponectina plasmática y los niveles en plasma de PAI-1. Por otro lado, mientras que el TNF- α aumenta la expresión de IL-6 y PAI-1, reduce los niveles circulantes de adiponectina (158).

Del mismo modo, existen muchos factores que juegan un importante papel en la regulación de los niveles de leptina: así su expresión aumenta por acción de la insulina, los glucocorticoides, el TNF- α , los estrógenos y CEBP α y disminuye por acción de los andrógenos, la hormona del crecimiento, los NEFA, la activación de la vía β_3 adrenérgica y los agonistas de los receptores activados por proliferadores peroxisomales de tipo gamma (PPAR γ) (159).

2.1.3. Antidiabéticos orales

De forma general, las intervenciones no farmacológicas encaminadas a la mejora de la resistencia a la insulina asociada a obesidad, que incluyen hábitos dietéticos saludables, la reducción del peso corporal y el incremento en la actividad física, han demostrado ser muy beneficiosas en el tratamiento de la resistencia a la insulina. Sin embargo, la terapia que ha demostrado producir mayores beneficios hasta el momento, consiste en la administración de antidiabéticos orales (160). El principal efecto de estos fármacos es la corrección de la hiperglucemia en ayunas que se observa en individuos con resistencia a la insulina (161). Este aumento de las concentraciones de glucosa es causado por alteraciones en la regulación de los patrones circadianos de hormonas y como consecuencia de un aumento en la producción de glucosa en hígado y riñón. De hecho, estos períodos de hiperglucemia repetidos aumentan el riesgo de padecer complicaciones cardiovasculares (162). Por estas razones, el principal objetivo terapéutico es la disminución de la hiperglucemia.

Entre los diferentes antidiabéticos orales utilizados de forma tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 se encuentran: los inhibidores de la alfa glucosidasa (acarbose), las sulfonilureas, las biguanidas (metformina) y los derivados del ácido benzoico. Estos agentes son utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2 bien en monoterapia, bien combinados o bien asociados a la administración de insulina. Como efectos secundarios principales del tratamiento con estos agentes destacan la hipoglucemia y/o efectos secundarios gastrointestinales.

Actualmente, existe en el mercado un nuevo grupo de agentes antidiabéticos, los agonistas

de los receptores PPAR γ . Las tiazolidinedionas (TZDs) constituyen una nueva clase de fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 que reducen las concentraciones de glucosa en ayunas y posprandiales así como las concentraciones de NEFA (163-166). Dado que estos agentes presentan la capacidad de modificar los mecanismos responsables de las complicaciones metabólicas y de las complicaciones vasculares en la diabetes tipo 2, aumentando la sensibilidad a la insulina a través de la activación del receptor PPAR γ (167) se describen en detalle las características y funciones de los receptores activados por proliferadores peroxisomales.

3. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES

Es ampliamente reconocido que, aunque los mamíferos pueden sintetizar grasa endógenamente, la principal fuente de lípidos es su absorción directa desde la dieta. El hígado es capaz de regular parcialmente los niveles de lípidos circulantes modulando los flujos de captación de ácidos grasos, su esterificación para generar triglicéridos, y así almacenarlos o exportarlos a la circulación, o bien su catabolismo mediante la oxidación.

Por otro lado, avances en el conocimiento del metabolismo lipídico, han permitido determinar el papel central del adipocito en la regulación de la homeostasis lipídica del organismo y del control del balance energético. El almacenaje y liberación de ácidos grasos y glicerol a circulación sanguínea por parte del adipocito va a condicionar la homeostasis lipídica, así como el metabolismo hepático y periférico de la glucosa. Asimismo, como se ha comentado anteriormente, el tejido adiposo secreta

diversas citoquinas con funciones endocrinas como la leptina (168), adiponectina (169) o resistina (170), factores del complemento y péptidos bioactivos, todos ellos participantes en la regulación del balance energético (171).

Los receptores nucleares de hormonas, comprenden una extensa familia de factores de transcripción que tras su unión a su correspondiente ligando pueden regular la expresión de diversos genes relacionados con la homeostasis, el desarrollo y la reproducción en células eucariotas (172;173). A diferencia de los receptores de membrana, estos receptores ejercen su regulación de la expresión de los genes a través de su unión directa al propio ADN.

3.1. Clasificación

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) son factores de transcripción dependientes de ligando pertenecientes a la familia de los receptores nucleares de hormonas. Su existencia fue postulada tras la observación de un aumento de la proliferación peroxisomal tras el tratamiento con unos agentes hipolipemiantes denominados de forma genérica proliferadores peroxisomales (174). Esta hipótesis fue corroborada tras la clonación en hígado de ratón de un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas, que una vez activado por dichos ligandos, inducía la proliferación de los peroxisomas (175). Poco después, tres receptores con similitudes funcionales y estructurales fueron clonados en *Xenopus*. Estos receptores fueron denominados PPAR α , PPAR β (también denominado PPAR δ) y PPAR γ , a pesar de que estos dos últimos no inducían la proliferación peroxisomal (176).

Tabla 33: Diferente expresión de los tres subtipos de PPAR en tejidos de roedor adulto

TEJIDOS	PPAR α	PPAR β	PPAR γ
SNC	+/-	++	+/-
Epidermis	+/-	+++	-
Tracto digestivo	++	++	++
Hígado	+/++++ ^a	++	+/-
Páncreas	+	++	+
Riñón	++	++	+/-
Sistema inmune	++	+++	++
Corazón	-/+ ^a	-/+ ^a	-
Músculo esquelético	++	+++	+
Tejido adiposo blanco	+	++	+++
Tejido adiposo marrón	+++	++	++

La detección específica de cada proteína se realizó mediante hibridación *in situ*. -: ausente; +/-: apenas detectable; +: expresión débil; ++: expresión moderada; +++: expresión alta; ++++: expresión muy alta.; superíndice a: existe apreciable variabilidad interindividuo. (177;178).

3.2. Expresión tisular de los receptores PPAR

Las tres isoformas de PPAR se expresan en numerosos tipos de células, aunque los niveles relativos varían de un tipo de célula a otra, existiendo incluso coexpresión de las tres isoformas en un mismo tejido aunque en niveles diferentes.

El patrón de expresión es diferente para las distintas especies y al menos en el caso de la rata, el patrón de expresión en los tejidos es independiente del sexo (179). Los tres subtipos ya se expresan durante el desarrollo embrionario de roedores, aunque PPAR α y PPAR γ aparecen relativamente tarde; siendo PPAR β el más abundante en este período.

En roedores, el PPAR α tiene una expresión elevada en tejido adiposo marrón, hígado, riñón, corazón, mucosa estomacal y duodeno (178;180;181). El PPAR β se expresa de forma ubicua en roedores, con niveles de expresión más elevados que el resto de las isoformas en la mayoría de los tejidos estudiados (178;181), siendo especialmente significativo en la epidermis y en el tejido nervioso (182;183). Por su parte, el PPAR γ en roedores presenta

un perfil de expresión limitado fundamentalmente al tejido adiposo blanco, y tejido adiposo marrón (181). Asimismo, se expresa en niveles moderados en los tejidos linfoides, como bazo y tracto digestivo. También existe expresión en retina y músculo esquelético, aunque con niveles bajos (178;184).

Más recientemente, se ha observado, que tanto PPAR α como PPAR γ se expresan en células de la musculatura endotelial, células de la musculatura lisa y en macrófagos (185-187).

3.3. Funciones generales

El descubrimiento de que los PPAR son las dianas principales para diferentes clases de compuestos sintéticos utilizados en el tratamiento de la diabetes y la dislipemia, ha permitido ir avanzando en el conocimiento de sus respectivas funciones. Así, el conocimiento y caracterización de los mecanismos moleculares de estos receptores resulta imprescindible para el desarrollo y la futura utilización de fármacos para tratar este tipo de trastornos metabólicos.

Parece ser que los PPARs, de una manera u otra, participan en la regulación de los metabolismos glucídico, lipídico y aminoacídico, en el control de la respuesta inflamatoria, en la homeostasis energética, en la diferenciación del adipocito y en el proceso apoptótico (188). Los agonistas de los receptores PPAR α han demostrado su eficacia en la disminución de la hiperinsulinemia e hiperglucemia en roedores con resistencia a la insulina secundaria a una dieta rica en grasas o a una obesidad de tipo genético. El mecanismo hipolipemiante de los agonistas del PPAR α parece deberse a un aumento en la oxidación hepática de los ácidos grasos y a una reducción en la síntesis y secreción de los triglicéridos por el hígado (189-192). De una manera general, se podría afirmar que PPAR α media sus efectos principalmente a través de la estimulación de la oxidación de lípidos, mientras que el PPAR γ lo hace promoviendo el almacenamiento lipídico.

En cuanto a la isoforma β , sus funciones son esencialmente desconocidas, si bien se ha llegado a relacionar con la mielogénesis y la maduración de las células de la glia en el sistema nervioso central (193;194), así como la implantación del embrión en el útero (195;196), contribuyendo por tanto a la fertilidad.

Debido al enorme interés suscitado entre la comunidad científica, se han propuesto funciones adicionales para los receptores PPAR. De esta forma, se ha postulado la intervención de los receptores PPAR α y PPAR γ en la formación y estabilización de la placa de ateroma, tono vascular y angiogénesis, así como un papel importante en la regulación de la inflamación (197). Asimismo, parece que PPAR α , PPAR β y PPAR γ están implicados en el desarrollo y

diferenciación celulares tanto de líneas normales como tumorales (198).

Dado que en el presente trabajo se evalúa el efecto de un agonista del receptor PPAR γ , se describirán en detalle las principales funciones fisiológicas de este receptor.

3.4. Receptor activado por proliferadores peroxisomales tipo γ

3.4.1. Estructura

El receptor PPAR γ , al igual que el receptor de hormona tiroidea, el receptor del ácido retinoico y el receptor de vitamina D, se engloba dentro de los receptores nucleares de clase II (173). Estos receptores están compuestos de 6 regiones estructurales (A-F) (**figura 3**) que confieren cuatro dominios funcionales (173). El dominio AF-1 situado en el extremo N terminal, está compuesto por las regiones A y B, y es responsable de la activación independiente de ligando. La modificación covalente de este dominio (199) puede cambiar la afinidad de unión al ligando del receptor.

La región C (**figura 3**) es la región más conservada entre todos los receptores nucleares. Es precisamente, a través del dominio C mediante el cual se establece la unión a secuencias de nucleótidos concretas de las regiones reguladoras de los genes respuesta que se denominan PPRE (elemento respuesta a PPAR) (200).

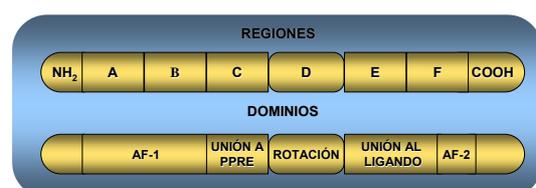


Figura 3: Regiones estructurales y dominios funcionales del receptor PPAR γ .

La región D (**figura 3**) permite la rotación del dominio de unión al ADN y sirve como nexo de unión a las regiones E y F, que contienen el dominio de unión al ligando, así como las zonas de unión a coactivadores y correpresores (201). Los resultados de cristalografía de rayos X del dominio de unión al ligando del PPAR γ humano muestran un bolsillo de unión al ligando de gran tamaño, lo cual permitiría la unión de un gran número de ligandos con estructuras muy diversas (202), como se describe más adelante.

Asimismo, junto al extremo C terminal y englobado en el dominio de unión al ligando existe un segundo dominio de activación de función (AF-2). De esta forma, la unión de agonistas al dominio AF-2 conduce a una estructura conformacional activa del receptor y a un aumento en la actividad del mismo. De forma contrapuesta, la unión de antagonistas al dominio AF-2 conduce a un estado conformacional del receptor en la que la unión al ligando se encuentra impedida (203).

De forma general, y al igual que ocurre con el resto de los receptores nucleares, el receptor PPAR γ está compuesto de un dominio de unión al ligando, un dominio de unión al ADN y dos dominios que modulan la activación de la función.

3.4.2. Isotipos del receptor PPAR γ

Hasta el momento se han identificado siete ARNm del receptor PPAR γ . Todos ellos son codificados por el mismo gen por medio de diferentes puntos de inicio de transcripción y ajuste alternativo de 5 exones (A1, A2, B, C y D), localizados en la región 5' terminal (204;205). Los isotipos PPAR γ -1 y PPAR γ -2 presentan una expresión elevada en tejido adiposo e intestino grueso, una expresión intermedia en riñón, hígado e intestino delgado, y una expresión baja en músculo

(206). La expresión de PPAR γ -3 se encuentra limitada al tejido adiposo blanco y al intestino grueso (207). Finalmente, el PPAR γ -4 y PPAR γ -5 se expresan solamente en macrófagos, mientras que los isotipos PPAR γ -6 y PPAR γ -7 son específicos de tejido adiposo (208). De esta forma, la existencia de diferentes isoformas y la expresión diferencial de las mismas en los tejidos, podría aumentar la diversidad de ligandos de estos receptores y de las respuestas transcripcionales específicas de cada tejido (209).

3.4.3. Ligandos del receptor PPAR γ

El receptor PPAR γ , a diferencia de otros receptores nucleares, presenta un bolsillo de unión al ligando de gran tamaño, lo cual le confiere la capacidad de interactuar con una gran variedad de ligandos (210;211).

Los ligandos del receptor PPAR pueden clasificarse en:

- *ligandos naturales*, como los ácidos grasos de cadena media y larga y los eicosanoides (212) y
- *ligandos sintéticos*, dentro de los cuales se engloban varios herbicidas y agentes plastificadores, ciertos agentes hipolipemiantes, diversos antiinflamatorios y compuestos sensibilizadores a la insulina o agentes antidiabéticos (213).

a) *Ligandos naturales*

Los PPARs son activados por una gran variedad de ácidos grasos naturales y, en general, presentan una mayor respuesta a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) ω -3 y ω -6 de cadena larga (214). En el caso concreto del receptor PPAR γ , se ha descrito que tanto los ácidos grasos monoinsaturados, como los poliinsaturados son capaces de unirse al

receptor, incluso a concentraciones fisiológicas (215).

Los eicosanoides son derivados del ácido araquidónico, que actúan como precursores de los leucotrienos a través de la vía de la lipooxigenasa y como precursores de la formación de prostaglandinas por acción de la ciclooxigenasa. Todos estos metabolitos del ácido araquidónico: eicosanoides, leucotrienos y prostaglandinas, pueden funcionar en mayor o menor medida como activadores fisiológicos del receptor PPAR γ (216-218).

Cabe destacar que el hecho de que los ácidos grasos y sus metabolitos derivados actúen como ligandos del receptor PPAR γ ha permitido sugerir que este factor de transcripción actúa como un sensor fisiológico del metabolismo lipídico del organismo.

b) Ligandos sintéticos

Tras su clonación en *Xenopus laevis*, se observó que el receptor PPAR γ podía ser activado por diferentes agentes conocidos que inducían la proliferación peroxisomal, tales como el Wy-14,643, el nafenopino, el ácido clofíbrico, la warfarina y el ácido tricloroacético (219). Asimismo, se ha demostrado que fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como el ibuprofeno, fenoprofeno y el ácido flufenámico, son ligandos capaces de activar tanto la isoforma α como la isoforma γ (220).

Sin duda, los compuestos agonistas del receptor PPAR γ con mayor importancia terapéutica hasta el momento son las tiazolidinedionas (TZD). En 1997 se aprobó la troglitazona como agente hipoglucemiante para el tratamiento de pacientes con diabetes tipo 2; sin embargo tuvo que ser retirada del mercado 3 años más tarde por presentar efectos secundarios en el hígado (221). Actualmente, están disponibles otras TZDs que vienen siendo usadas en la práctica

clínica para tratar la resistencia a la insulina en pacientes con diabetes tipo 2 (222-225), como la rosiglitazona y la pioglitazona. Estas TZDs son mejor toleradas por el hígado; aún así, su utilización no está indicada en pacientes con disfunción hepática. Asimismo, existe gran variedad de compuestos actualmente en ensayos clínicos, entre los que se encuentra la englitazona, y que están pendientes de su aprobación para su utilización en humanos (226).

La búsqueda de nuevos ligandos de los receptores PPAR γ para el tratamiento de la diabetes tipo 2 ha permitido el descubrimiento de agonistas de los receptores PPAR γ derivados de la tirosina (227) y del ácido oximiinoacético (228) que a pesar de no tener similitud estructural con las TZDs, presentan efectos antidiabéticos comparables o incluso superiores a los de las TZDs en animales diabéticos (229;230). Además, el aumento de peso corporal, que es el principal efecto secundario derivado del uso de las TZDs, no se observa tras el tratamiento con estos fármacos (231).

3.5. Modulación de la transcripción por PPAR γ

En ausencia del ligando, el receptor PPAR se encuentra en el núcleo formando heterodímeros asociado al receptor X del ácido 9-cis retinoico (RXR) (232). Estos heterodímeros forman parte de complejos multiproteicos que incluyen correpresores, chaperonas y proteínas que presentan actividad desacetilasa de histonas (233). Estos complejos difunden por la cromatina, y al interactuar con la región promotora de un gen, pueden quedar estabilizados por un período de tiempo, suprimiendo la

transcripción de un gen mediante la desacetilación de histonas. Tras la unión al ligando, se establece la unión del heterodímero PPAR-RXR al ADN, en concreto a zonas denominadas elementos respuesta a proliferadores peroxisomales (PPRE), que se localizan en la zona promotora del correspondiente gen diana (234). Estos elementos respuesta a proliferadores peroxisomales suelen ser dos hexanucleótidos con la secuencia consenso AGGTCA colocados en repetición directa y separados por un único nucleótido (DR-1). Esta secuencia o similar, se ha encontrado en un elevado número de genes inducibles por PPAR γ .

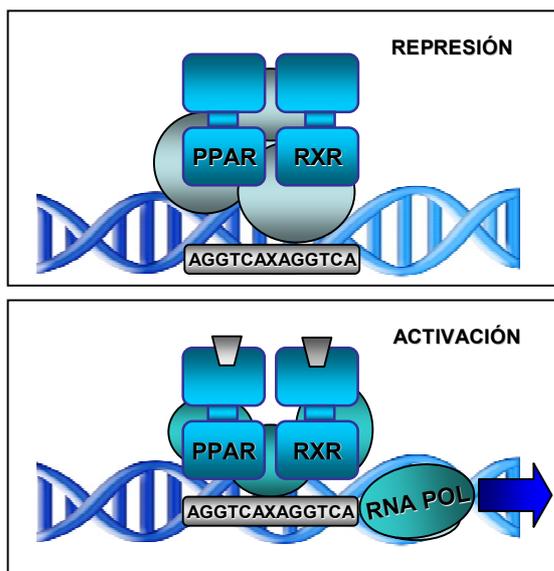


Figura 4: Mecanismo de transactivación del PPAR γ .

La interacción del heterodímero PPAR-RXR con el ADN, produce el reclutamiento de coactivadores que median la capacidad de los receptores nucleares para iniciar la transcripción (235). En primer lugar, se produce la unión de coactivadores con actividad acetilasa de histonas, lo cual disminuye la interacción de éstas con el ADN, desorganizando los nucleosomas y abriendo la

cromatina (236). A continuación, se produce la unión de un segundo grupo de coactivadores que presentan actividad acetil-transferasa de histonas y producen remodelación de la cromatina dependiente de ATP. Esta remodelación permite la formación de un puente entre el receptor nuclear y la maquinaria de transcripción, organizando un bucle de ADN y aportando así, un sitio de anclaje para la ARN polimerasa, lo que permite el inicio de la transcripción (237). Las interacciones entre el ligando, el heterodímero PPAR-RXR, las proteínas coactivadoras y/o correpresoras y la maquinaria de transcripción, modulan el inicio de la transcripción, así como la abundancia de ARNm de los genes diana (238).

3.6. Funciones del PPAR γ

3.6.1. Diferenciación del adipocito

El papel mejor caracterizado del PPAR γ es su mediación en la diferenciación del adipocito (239;240). La expresión del PPAR γ aumenta en fases tempranas de la diferenciación del preadipocito a células grasas maduras, actuando conjuntamente con las proteínas de unión a intensificadores de tipo CCAAT (C/EBPs) y las proteínas de unión a elementos respuesta a esteroides (SREBPs), para coordinar una diferenciación completa (239;241;242).

Las hormonas adipogénicas (insulina, dexametasona e isobutilmetilxantina), inducen inicialmente la expresión de CEBP β y δ que actúan de forma sinérgica induciendo la expresión de CEBP α y PPAR γ . Tras su inducción, CEBP α y PPAR γ son capaces de inducir la expresión el uno del otro, e inducir la

expresión de genes específicos del adipocito que son requeridos para la síntesis, captación y almacenamiento de ácidos grasos y para aumentar el número de adipocitos.

Esta actividad adipogénica queda patente *in vitro*, por la capacidad de forma dosis dependiente de las TZDs, de promover la diferenciación de fibroblastos en cultivo a células adiposas maduras (243) y por la captación de lípidos y expresión de marcadores típicos de adipocitos tras la expresión ectópica conjunta de PPAR γ y CEBP α en mioblastos, células sin capacidad adipogénica inherente (244). Por otro lado, el bisfenol A diglicidil eter, un ligando sintético del receptor PPAR γ que se une a dicho receptor pero que es incapaz de estimular la transcripción, bloquea de una forma específica la diferenciación a adipocitos de las líneas celulares 3T3-L1 y 3T3-F442A (245-248).

Dado que la inactivación homocigota del gen del PPAR γ resulta letal para el embrión y produce anomalías placentarias, no se ha podido generar un ratón *knock out* para PPAR γ que favorezca el estudio definitivo de sus funciones (249). Sin embargo, varios grupos han demostrado que fibroblastos embrionarios derivados de ratones PPAR γ *-/-* son incapaces de diferenciarse a adipocitos *in vitro* (250;251). Asimismo, se han descrito mutaciones en los receptores PPAR γ relacionadas con hiperlipemia y/o obesidad en diferentes poblaciones humanas (252).

En lo que respecta al tejido adiposo, se ha descrito una serie de genes relacionados con el metabolismo lipídico y la sensibilidad a la insulina que se comportan como dianas directas de los receptores PPAR γ . En lo que respecta al metabolismo lipídico, la activación del PPAR γ aumenta la expresión de la proteína de unión de ácidos grasos (FABP)

(253) la proteína transportadora de ácidos grasos específica del adipocito (aP2) (254), la lipoproteína lipasa (LPL) (255), la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) (256), CD36 (257), adipofilina (258), la acilCoA sintetasa de cadena larga (256;259;260), la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK) (261) y la glicerol quinasa (262).

Asimismo, el PPAR γ disminuye la expresión de varias proteínas implicadas en el desarrollo de resistencia a la insulina (263) como el TNF- α , la leptina, el PAI-1, la resistina (264), la IL-6 y la 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1. Por otro lado, la activación del PPAR γ induce la expresión de genes implicados con el aumento en la sensibilidad a la insulina tales como la adiponectina, el receptor de insulina, IRS-1, IRS-2 (265), PI $_3$ K, proteína asociada a c-Cbl y GLUT-4.

La acción adipogénica del tratamiento oral con TZDs cursa con un aumento de la adiposidad y un aumento de la masa corporal que acompaña a los efectos terapéuticos en la homeostasis de la glucosa. Estudios más a fondo han demostrado que la activación del PPAR γ no solamente causa un aumento de la masa adiposa sino que cursa con un remodelamiento mucho más sofisticado. Se ha demostrado, que tras la activación del receptor se produce una inducción en la diferenciación adipocitaria generando adipocitos de pequeño tamaño, más sensibles a la acción de la insulina que los de tamaño mayor (266) y reduciendo mediante apoptosis el número de adipocitos hipertrofiados (267;268). A diferencia de los adipocitos hipertrofiados que tienden a liberar NEFA y secretan adipoquinas, que contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina, los adipocitos más pequeños tienden a captar los NEFA y almacenarlos, disminuyendo así los niveles de NEFA circulantes (269).

Por último, se ha propuesto que los efectos de la activación del receptor PPAR γ sobre la apoptosis y diferenciación adipocitaria son diferentes en función de la localización del tejido adiposo en el organismo. En este sentido la diferenciación de nuevos adipocitos tiene lugar en el tejido adiposo subcutáneo, mientras que la apoptosis de los adipocitos hipertrofiados tiene lugar en el tejido adiposo visceral (270;271), el cual parece contribuir más activamente a la liberación de NEFA y al desarrollo de la resistencia a la insulina (272). De esta forma, la activación del receptor PPAR γ produce una redistribución de la grasa, la captación de los NEFA por el tejido subcutáneo y una disminución de la resistencia a la insulina. Sin embargo, como efecto secundario a los fenómenos de diferenciación y reordenamiento de las reservas grasas la activación del receptor PPAR γ produce un aumento en el peso corporal en los pacientes tratados con TZDs.

3.6.2. Metabolismo lipídico

Se ha comprobado que la activación del receptor PPAR γ , tras el tratamiento con TZDs disminuye los triglicéridos plasmáticos a través de la modulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico. Este efecto parece ser dependiente de la expresión de la LPL en tejido adiposo. Así, se ha postulado que las TZDs aumentan la captación de NEFA procedentes de la hidrólisis de triglicéridos circulantes por el tejido adiposo, tras la inducción de la LPL (255).

Asimismo, se ha demostrado que la activación del receptor PPAR γ por TZDs reduce los niveles circulantes de NEFA mediante un aumento en la expresión de la proteína transportadora de ácidos grasos FAT/CD36 (257;273) en el tejido adiposo. Esta proteína está implicada en la captación de NEFA por

parte del adipocito y podría contribuir a la mejora en la sensibilidad a la insulina. De hecho, la sobreexpresión de esta proteína en ratones que presentan resistencia a la insulina normaliza la hiperglucemia e hiperinsulinemia y mejora la sensibilidad a la insulina en hígado (274). Una vez transportados al interior celular, los NEFA son almacenados como reserva energética en el adipocito tras su activación a acilCoA y su unión al glicerol 3 fosfato en forma de triacilgliceroles. El glicerol 3-fosfato puede ser producido en los adipocitos por dos vías de síntesis diferentes, la glicerolneogénesis y la glucólisis (275-277). Se ha demostrado que la activación del receptor PPAR γ aumenta la expresión de las proteínas clave de ambas rutas sintéticas (278;279). En primer lugar se han localizado dos PPRES en el gen de la fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (PEPCK) en los que puede anclarse el receptor PPAR γ . Asimismo, se ha descrito que una mutación en uno de estos PPRES del gen de la forma citosólica de la PEPCK reduce el tamaño del tejido adiposo y su contenido lipídico en ratones (280). Estos resultados sugieren que la activación del receptor PPAR γ produce un aumento en la gliceroneogénesis y como consecuencia un aumento en los niveles de glicerol-3-fosfato (281).

Por otro lado, las TZDs aumentan la expresión de la glicerol quinasa en el adipocito, lo cual indicaría que la segunda vía posible de formación de glicerol-3-fosfato estaría también aumentada tras el tratamiento (282). Como consecuencia, este aumento sinérgico en la concentración intracelular de glicerol-3-fosfato estaría aumentando en gran medida la síntesis de triglicéridos y disminuyendo el flujo de NEFA al torrente sanguíneo, lo cual estaría contribuyendo a la mejora en la sensibilidad a la insulina observada tras el tratamiento con TZDs (283).

3.6.3. Regulación de la homeostasis glucídica

Los agonistas del PPAR γ han demostrado ser reguladores de la homeostasis glucídica aumentando la respuesta a la insulina en pacientes con diabetes tipo 2, tanto en el tejido adiposo, como en el hígado y el músculo, por lo que se están empleando actualmente en la práctica clínica (284).

Recientemente, se ha caracterizado la función del PPAR γ en el tejido adiposo y músculo mediante el empleo de delecciones tejido-específicas del receptor. Estos estudios han concluido que el receptor PPAR γ actúa como mediador de la respuesta a la insulina en ambos tejidos mediante dos mecanismos. Por un lado, el receptor PPAR γ impide la acumulación excesiva de grasa en los tejidos no adiposos. Por otro lado, regula la secreción de factores producidos por el tejido adiposo y que están implicados en la respuesta a la insulina (285). De esta forma, el efecto sobre los adipocitos es transmitido a otros tejidos a través de mediadores endógenos como son el TNF- α (286), la adiponectina (287), la resistina (119) o los NEFA (288).

No obstante, la activación del PPAR γ podría tener efectos directos sobre la señalización insulínica. Se ha demostrado que la sobreexpresión del PPAR γ restaura los niveles de expresión del receptor de insulina y del IRS-1 en adipocitos que presentan resistencia a la insulina como consecuencia de una exposición crónica a TNF- α . Por otro lado, también se ha descrito un aumento de la expresión IRS-2, en los adipocitos y en el tejido adiposo humano incubado con agonistas del PPAR γ (265). Asimismo, se han descrito efectos directos de las TZDs sobre la expresión de la PI $_3$ K en adipocitos humanos (289) y un aumento en la fosforilación basal de

la Akt en pacientes normoglucémicos tratados con troglitazona (290). Por último, otros autores han descrito que el tratamiento con TZDs parece corregir la deficiencia en el transporte de glucosa en ratones obesos mediante la inducción de la expresión y la translocación del transportador de glucosa regulado por insulina, GLUT-4, en tejido adiposo (291). Este efecto se debe a la activación del receptor PPAR γ , que aumenta los niveles de expresión de la proteína asociada a c-Cbl (CAP), proteína que actúa como puente entre el receptor de insulina y c-cbl, que está implicada en la translocación de GLUT-4 estimulada por insulina y cuyos niveles se encuentran disminuidos en individuos insulino-resistentes.

No obstante, los resultados de los efectos directos de las TZDs sobre la cascada de señalización de la insulina resultan en algunos casos contradictorios.

3.6.4. Regulación de la secreción de citoquinas

a) Efectos sobre el TNF- α

Se ha propuesto que las TZDs podrían disminuir la resistencia a la insulina a través tanto de la inhibición de la producción de TNF- α por parte del adipocito, como bloqueando sus efectos (292).

El tratamiento de adipocitos con TNF- α produce resistencia a la insulina a través de una disminución de los niveles del receptor de insulina e IRS-1. La sobreexpresión del receptor PPAR γ en este tipo celular restaura los niveles del receptor de insulina e IRS-1 revirtiendo de esta forma la resistencia a la insulina. En segundo lugar, la activación del receptor PPAR γ bloquea el factor nuclear NF κ B, el cual es uno de los principales

mediadores de los efectos del TNF- α . Finalmente, los agonistas del PPAR γ disminuyen la expresión de TNF- α en tejido adiposo de ratones obesos a los niveles de los ratones delgados (293) y revierten la resistencia a la insulina inducida por TNF- α (294).

Sin embargo, dado que las TZDs pueden mejorar la sensibilidad de insulina en ratones que presentan resistencia a la insulina pero que no expresan TNF- α de manera funcional, deben existir otros mecanismos de acción diferentes.

b) Efectos sobre la leptina

La leptina es una proteína secretada por los adipocitos que disminuye la ingesta y aumenta el catabolismo lipídico. Sin embargo, la hiperleptinemia, disminuye la sensibilidad a la insulina (295) y, de hecho, se ha descrito una fuerte correlación entre la obesidad, la hiperinsulinemia y la hiperleptinemia.

El tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con TZDs produce una disminución en la expresión del gen de la leptina a través de la interacción del receptor PPAR γ sobre el promotor del gen de la leptina y con una eficacia que depende de la capacidad de cada ligando de unirse y estimular al receptor PPAR γ (296;297). Esta disminución en los niveles de leptina tras el tratamiento con TZDs permitiría explicar el aumento de la ingesta y el almacenamiento calórico observado *in vivo* tras el tratamiento con agonistas del PPAR γ (298).

c) Efectos sobre la resistina

Como se ha comentado anteriormente, la resistina es una adipocitoquina que según estudios iniciales altera la tolerancia a la glucosa y la acción de la insulina y cuyos niveles plasmáticos aumentan en la obesidad,

por lo que se propuso como el nexo de unión entre la resistencia a la insulina y la obesidad (170). Sin embargo, esta relación entre los niveles de resistina, diabetes y obesidad no está del todo clara (264).

Existen diferentes estudios que muestran que las tiazolidinedionas disminuyen los niveles de resistina en el plasma de los pacientes con diabetes tipo 2 (299;300) la cual se correlaciona con una disminución en el contenido de grasa hepática y con un aumento en la sensibilidad a la insulina. Dado que el promotor del gen de la resistina presenta varios PPREs (301), se ha propuesto que la disminución en la expresión de la resistina es consecuencia de la activación del receptor PPAR γ . De esta forma, podría contribuir a la mejora en la sensibilidad a la insulina observada tras el tratamiento con tiazolidinedionas (302).

Sin embargo, los resultados de otros estudios muestran que la expresión de la resistina se encuentra dramáticamente disminuida en el tejido adiposo de distintos modelos experimentales de diabetes y obesidad (303) y que la mejora en la sensibilidad a la insulina por efecto de las TZDs no se debe a cambios en la secreción de resistina (303). Hasta el momento, la discrepancia de los trabajos disponibles no permite determinar el papel de la resistina en la homeostasis metabólica y en el desarrollo de la resistencia insulínica.

d) Efectos sobre la adiponectina

La adiponectina es una proteína secretada a la circulación por los adipocitos maduros, y sus niveles plasmáticos parecen correlacionar muy bien con la sensibilidad a la insulina tanto *in vivo* como *in vitro* (150) por lo que se han propuesto como un índice de la sensibilidad a la insulina en los pacientes que presentan diabetes tipo 2 (151). En este sentido, los

niveles de adiponectina se encuentran disminuidos en diferentes patologías que cursan con resistencia a la insulina, como son la obesidad, la diabetes y las lipodistrofias (142;154).

El tratamiento con TZDs aumenta la actividad del promotor de la adiponectina, su expresión y su secreción (304;305). A su vez, la administración de TZDs mejora la sensibilidad a la insulina y aumenta los niveles séricos de adiponectina tanto en individuos normales, como en humanos y roedores con resistencia a la insulina (304;306;307). Este efecto parece ser mediado por el receptor PPAR γ ya que los individuos con mutaciones dominantes en el gen del PPAR γ , presentan resistencia a la insulina asociada a una disminución en los niveles plasmáticos de adiponectina (308). Sin embargo, no queda claro si este aumento de la expresión de la adiponectina es debido a la presencia de un elemento respuesta a PPAR γ en el promotor de la adiponectina (309) o a un efecto indirecto debido a cambios en la expresión de otros genes inducidos por el PPAR γ (310).

4. GESTACIÓN

A lo largo de la gestación se producen en la madre una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos dirigidos a garantizar un continuo aporte de sustratos al feto, a mantener una adecuada homeostasis metabólica en la propia madre y a prepararla para la lactancia (311). Así, la madre debe mantener un continuo aporte de sustratos al feto, fundamentalmente glucosa y aminoácidos, para garantizar el adecuado crecimiento fetal (312;313). Como consecuencia de esta continua transferencia de nutrientes, se producen cambios en el metabolismo de la madre, siendo de especial

relevancia los cambios en el metabolismo lipídico y glucídico. Cabe destacar, que muchos de los cambios metabólicos que tienen lugar en este período son consecuencia de variaciones en los factores hormonales maternos, siendo de especial importancia las variaciones en la concentración de insulina plasmática, así como la diferente sensibilidad tisular a dicha hormona.

Durante la gestación se ponen de manifiesto dos etapas diferenciadas desde el punto de vista metabólico. Durante la primera de estas etapas, denominada “anabólica”, el crecimiento de las estructuras feto-placentarias es mínimo, y en ella la madre aumenta su peso corporal debido a un incremento en sus reservas grasas. La segunda fase se denomina “fase catabólica”, y en ella tiene lugar un incremento simultáneo de procesos de síntesis y degradación, que permiten una redistribución de las reservas maternas disponibles en beneficio del crecimiento fetal (314).

4.1. Cambios metabólicos y hormonales durante la primera etapa de la gestación.

Durante los dos primeros tercios de la gestación, antes de que se inicie el crecimiento del “conceptus” (feto, líquido amniótico y placenta), la madre se encuentra en un estado anabólico, en el que se produce un continuo incremento de su peso corporal. Este aumento en el peso libre de conceptus, se ha determinado tanto en la mujer (315), como en la rata (316), y es debido fundamentalmente al acúmulo en las reservas grasas, aunque existe prácticamente un aumento en la masa de todos sus órganos y tejidos (315). Este incremento en los depósitos

grasos durante la fase anabólica permite garantizar el adecuado desarrollo fetal durante etapas posteriores, ya que en condiciones en que este acúmulo de reservas no tiene lugar, como es el caso del hipotiroidismo (317), la diabetes severa (318) y la subnutrición durante la primera mitad de la gestación (319) el correcto crecimiento intrauterino puede verse comprometido.

Este incremento en los depósitos grasos en la madre, es consecuencia de diferentes factores. Entre ellos destacan una marcada hiperfagia (320), un aumento en la lipogénesis en las estructuras maternas (320), un aumento en la actividad lipoproteína lipasa (321;322), un aumento en la sensibilidad a la insulina (323) y variaciones en la secreción de diferentes hormonas gestacionales.

4.1.1. Hiperfagia:

El incremento en la ingesta es detectable desde el primer día de la gestación y va aumentando progresivamente con el avance de la misma (324). Esta hiperfagia, que aporta suficiente cantidad de sustratos para la utilización y acúmulo por la madre, contribuye activamente al aumento en los depósitos grasos, habiéndose demostrado que la restricción calórica en esta etapa anabólica impide la acumulación de reservas energéticas en los depósitos grasos de la madre (319).

4.1.2. Aumento en la lipogénesis:

En lo que respecta a la síntesis de lípidos, se ha observado un aumento tanto en la lipogénesis como en la glicerolgénesis en la rata gestante, que se mantiene hasta el día 20 de gestación en la rata y decae momentos antes del parto (325). Asimismo, durante la etapa anabólica se ha descrito que existe un aumento en el efecto antilipolítico de la insulina (323). Esta disminución de la lipólisis

junto con el aumento en la síntesis de lípidos, parecen contribuir activamente en la acumulación de grasas durante los dos primeros tercios de la gestación (323).

4.1.3. Aumento en la actividad LPL:

La lipoproteína lipasa es una enzima localizada en la pared de los capilares que favorece tanto la hidrólisis de los triglicéridos de las lipoproteínas circulantes ricas en ellos (VLDL y quilomicrones), como la captación de los productos resultantes de la hidrólisis, NEFA y glicerol, por los tejidos subyacentes (326;327). Esta enzima se encuentra muy elevada en el tejido adiposo entorno a la mitad de la gestación (321;322), lo cual parece contribuir a su vez a la captación de triglicéridos y almacenamiento lipídico en dicha etapa.

4.1.4. Aumento en la sensibilidad a la insulina:

Desde los primeros días de la gestación el contenido pancreático de insulina aumenta (328), y eso favorece el incremento en la secreción de insulina por parte del páncreas a lo largo de la gestación (329), siendo al final de la gestación cuando se alcanzan los niveles más elevados de ésta (330;331). Asimismo, diferentes estudios muestran que además de un aumento en insulinemia, la respuesta a la administración intravenosa de insulina durante esta etapa se encuentra aumentada respecto a la rata virgen (332). Diversos estudios clínicos apoyan esta mejora en la respuesta a la insulina, ya que el requerimiento de insulina de mujeres diabéticas tipo 1 al final del primer trimestre de la gestación se encuentra disminuido (333), lo cual parece ser debido a un aumento en la sensibilidad a dicha hormona (334). Asimismo, durante esta etapa, la glucemia y la tolerancia a la glucosa en la

madre se mantienen bastante estables, induciendo incluso una etapa transitoria en la que dicha tolerancia llega a estar incrementada (328). Esta asociación de elevada hiperinsulinemia y aumentada sensibilidad a la insulina contribuye al menos en parte a la aumentada lipogénesis, glicerolgénesis y actividad lipoproteína lipasa (LPL) (335), así como a una menor actividad lipolítica del tejido adiposo (336) en esta etapa anabólica de la gestación(337).

Sin embargo, se ha observado que a medida que avanza la gestación y hacia el día 14 de gestación en la rata (323) y en la semana 30 en la mujer (338), se produce un estado de transición en el que la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la gestante se ven modificados.

4.2. Cambios metabólicos y hormonales durante la última fase de la gestación.

Durante el último tercio de la gestación se produce un rápido crecimiento fetal y hay una intensa transferencia placentaria de nutrientes. Como consecuencia, el metabolismo materno se encuentra en un estado catabólico (339-341), en el que las reservas lipídicas almacenadas durante la primera etapa sufren una redistribución en beneficio del crecimiento fetal. Este estado catabólico es especialmente patente en ayunas (342;343), situación en la que se produce un aumento de la cetogénesis y gluconeogénesis para garantizar el adecuado aporte de sustratos energéticos al feto.

En esta etapa, la unidad feto-placentaria extrae glucosa y precursores gluconeogénicos de la madre, produciendo en ella una disminución de la glucemia. Asimismo, durante

la tercera etapa de la gestación, coincidiendo con el máximo crecimiento fetal se produce hiperinsulinemia (331) y resistencia a la insulina (344). Este fenómeno tiene un sentido fisiológico, ya que disminuyendo la utilización de sustratos oxidativos en la madre existe una mayor disponibilidad de los mismos por la unidad fetoplacentaria. Como consecuencia de la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina en el último tercio de la gestación, se desarrolla en la madre una intensa hiperlipemia, la cual se debe fundamentalmente al aumento de los triglicéridos circulantes (345).

4.2.1. Hipoglucemia:

Como se ha comentado, en esta fase se produce en la madre una disminución de la glucemia, que se ha observado tanto en la mujer (346) como en la rata (347), siendo este cambio más pronunciado en situación de ayuno. Teóricamente, en condiciones de ayunas, situación en la que las reservas de glucógeno están agotadas, esta hipoglucemia podría ser consecuencia bien de una disminución en la gluconeogénesis o bien de un aumento en la tasa de utilización de la glucosa (348).

En la gestante a término, la gluconeogénesis depende tanto de la actividad de las enzimas gluconeogénicas, como de los niveles plasmáticos de precursores gluconeogénicos. En este sentido, se ha descrito un aumento en la actividad de las enzimas gluconeogénicas tanto en hígado como en riñón (349;350) y se ha observado que la capacidad de conversión a glucosa de estos sustratos está aumentada respecto a la rata virgen (351;352).

En lo que respecta a los niveles de sustratos gluconeogénicos, no se observan diferencias en los niveles de piruvato o lactato al compararlos con los de la rata virgen (353-

355), mientras que en ayunas existe una disminución en los niveles de aminoácidos gluconeogénicos (356;357). El hecho de que la conversión de glicerol a glucosa no requiere la entrada del mismo a la mitocondria, así como la elevada actividad de la glicerol quinasa en el hígado y la corteza renal, convierten al glicerol en un excelente sustrato gluconeogénico en la gestante a término, tanto en situaciones de ayuno, como de alimentación (358-360). Por tanto, se puede concluir que la actividad gluconeogénica en la rata gestante está aumentada en la madre al final de la gestación y que su efectividad depende de la disponibilidad de los diferentes sustratos (348). Sin embargo, el hecho de que una disminución en la tasa gluconeogénica no sea capaz de explicar la marcada hipoglucemia, permite concluir que hay una disminución en la tasa de utilización de la glucosa en los tejidos de la rata gestante a término al compararla con la rata virgen (361;362). Este efecto es consecuencia de la marcada captación y utilización de la glucosa por parte de los tejidos fetales, que puede llegar a representar hasta un 50% de la utilización materna de la glucosa (362-364). En este sentido se ha descrito que dada la incapacidad del feto de sintetizar glucosa, (365), la transferencia placentaria de glucosa es mucho mayor que la transferencia de alanina, ácido palmítico, glicerol y triglicéridos (313;366;367). Como conclusión, esta elevada transferencia placentaria de glucosa, dirigida a garantizar los elevados requerimientos fetales de glucosa, parece ser la responsable de la hipoglucemia presente en la gestante a término (368).

4.2.2. Cambios hormonales

Los niveles circulantes de lactógeno placentario, estrógenos y progesterona aumentan progresivamente durante el

transcurso de la gestación (369-371). Estas hormonas presentan efectos anti-insulínicos, lo que junto a la capacidad de la placenta de degradar insulina suponen un incremento en las necesidades insulínicas de la madre (372). Por otro lado, la hipoglucemia materna parece ser responsable de un aumento en la secreción de catecolaminas observado durante el último tercio de la gestación en la rata en ayunas. Es bien conocido que variaciones en la concentración de glucosa parecen afectar la secreción de hormonas por parte de la médula adrenal (373;374).

Este aumento en la secreción simpático-adrenal junto con el aumento en la secreción de hormonas gestacionales parecen contribuir activamente al aumento en la lipólisis en el tejido adiposo, a la hiperlipemia gestacional y en consecuencia a la movilización de las reservas grasas durante el último tercio de la gestación (375).

4.2.3. Hiperlipemia:

La actividad lipolítica y la lipemia plasmática (fundamentalmente los triglicéridos circulantes) van aumentando progresivamente con la gestación alcanzando el valor máximo en el último tercio y disminuyendo bruscamente tras el parto. Esta hipertrigliceridemia, que se ha observado tanto en la mujer (376) como en la rata (377) se traduce en un aumento de la síntesis endógena de triglicéridos, un aumento en la formación de VLDL y de la salida de éstas desde el hígado a la sangre (378). Este aumento en los triglicéridos plasmáticos es consecuencia de diferentes factores. En primer lugar, y tal y como se ha descrito anteriormente, durante la gestación se desarrolla hiperfagia (320). Por otra parte, como consecuencia de la activa lipólisis del tejido adiposo (379) se produce un aumento de los niveles circulantes de NEFA y glicerol

(380), lo cual contribuye a una mayor llegada de estos al hígado, pudiendo ser allí reesterificados. Asimismo, se ha demostrado que al final de la gestación, y como consecuencia de la menor sensibilidad a la insulina, se produce una disminución en la actividad de la LPL del tejido adiposo (381). Esta disminución en la actividad LPL en los tejidos maternos, impide el catabolismo normal de los triglicéridos transportados por las VLDL circulantes en la gestante a término y contribuye al incremento de sus niveles en plasma (382). Aunque los triglicéridos no pueden atravesar la barrera placentaria, la hipertrigliceridemia constituye una importante fuente de sustratos energéticos en condiciones de ayunas, dado que los productos de la hidrólisis de los triglicéridos pueden ser utilizados como fuente de energía mediante la cetogénesis hepática y la gluconeogénesis (383). Sin embargo, el papel más importante de esta hipertrigliceridemia en la gestante quizás sea su contribución para la síntesis de leche en la preparación para la lactancia (384). De hecho, a pesar de la marcada disminución de la actividad lipoproteína lipasa en prácticamente todos los tejidos maternos, existe un incremento de su actividad en glándula mamaria momentos antes del parto, que facilita el aclaramiento de los triglicéridos circulantes y su utilización para la producción de leche (385).

4.2.4. Hiperinsulinemia y resistencia a la insulina

Para hacer frente al aumento en las necesidades insulínicas, durante el último tercio de la gestación hay un aumento en la sensibilidad de la célula β -pancreática a los estímulos insulíntricos y un acelerado intercambio de insulina (342). Esta mayor respuesta de la célula β -pancreática durante la

tercera etapa de la gestación queda patente tras la sobrecarga tanto oral como intravenosa de glucosa en la madre, que se manifiesta con un mayor incremento tanto en los niveles plasmáticos de glucosa como de insulina (386;387).

Sin embargo, a pesar del incremento en los niveles circulantes de insulina en el último tercio de la gestación (331), se produce en la madre una disminución en la respuesta a dicha hormona (344). Este fenómeno, tiene un sentido fisiológico, ya que con la disminución de la utilización de sustratos oxidativos en la madre existe un mayor acceso de la unidad fetoplacentaria a los mismos. Ello permite garantizar la disponibilidad de sustratos al feto incluso en periodos de ayuno, en los que se produce una disminución significativa del peso corporal en la madre, sin que se vea afectado de forma sustancial el peso corporal de sus fetos (388).

Además, esta marcada disminución de la sensibilidad a la insulina en los tejidos maternos parece ser responsable de otros muchos cambios que tienen lugar en el último tercio de la gestación. De hecho, tal y como muestran resultados de nuestro laboratorio, la infusión intravenosa continua de glucosa durante 3 días a ratas gestantes revierte la resistencia a la insulina en la gestante a término y aumenta la respuesta a la estimulación por insulina de algunas de las rutas metabólicas que varían al final de la gestación (389). Estos resultados indican que la resistencia a la insulina en la gestante a término podría ser la responsable del aumento en la actividad lipolítica del tejido adiposo (340), de la disminución de la actividad LPL y de la disminución en la síntesis de glucógeno, características del último tercio de gestación (390).

Alteraciones en estos cambios en la sensibilidad a la insulina a lo largo de la gestación conducen a alteraciones en el desarrollo fetal. Por una parte, si no se produce resistencia a la insulina y los tejidos maternos no disminuyen su capacidad de utilización de los sustratos oxidativos, el feto no recibirá suficiente aporte de nutrientes y se producirá un retraso en el crecimiento fetal. Por el contrario, si la secreción de insulina no aumenta lo suficiente, se puede producir un síndrome conocido como diabetes gestacional, que cursa con una disminuida secreción de insulina e intolerancia a la glucosa y macrosomía fetal como consecuencia del aumento en la llegada de sustratos oxidativos a la unidad fetoplacentaria.

4.2.5. Origen de la resistencia a la insulina en la gestación

Como hemos comentado, se considera que el último tercio de la gestación es una situación fisiológica diabetogénica que se caracteriza entre otros por el desarrollo de resistencia insulínica, hiperinsulinemia e hiperlipemia (391).

En lo que respecta al origen de esta resistencia a la insulina durante el final de la gestación existe bastante controversia debido a la disparidad de resultados obtenidos.

Tradicionalmente, se ha considerado que el origen de la resistencia a la insulina en la gestación podría estar relacionado con el incremento en la secreción de hormonas gestacionales tales como el lactógeno placentario, los estrógenos y la progesterona. Algunos autores han descrito que el lactógeno placentario podría contribuir al desarrollo de dicha resistencia a la insulina (392;393). Por otro lado, el tratamiento con progesterona disminuye la respuesta a la insulina en músculo y tejido adiposo, mientras que

clásicamente se ha considerado que el tratamiento con estradiol aumenta la sensibilidad a la insulina en el organismo (394). Sin embargo, en un estudio reciente en el que se trataron ratas con diferentes dosis de estradiol se observó que aquellos animales que presentaban concentraciones de estradiol similares a las que se observan al final de la gestación presentaban resistencia a la insulina (395;396). Asimismo, el tratamiento combinado de estradiol con progesterona parece neutralizar la mejora en la sensibilidad a la insulina que se observa tras el tratamiento con estradiol (397) e incluso podría inducir resistencia a la insulina (398).

No obstante, aunque las hormonas gestacionales puedan contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina, otros factores parecen contribuir, ya que no existe correlación entre los niveles de dichas hormonas y los cambios en la sensibilidad a la insulina a lo largo de la gestación (399), si bien podrían ejercer su efecto modulando la concentración de otros parámetros, como los NEFA.

En este sentido, al final de la gestación existe un aumento en la actividad lipolítica del tejido adiposo con la consiguiente liberación de NEFA y glicerol a la circulación (323;400), los cuales se han relacionado con diferentes procesos que cursan con resistencia a la insulina (401-403). De hecho, los NEFA se han propuesto como nexo de unión entre la obesidad y la resistencia insulínica en la diabetes tipo 2 (404). Por esta razón, diferentes autores han tratado de demostrar que la elevación de los NEFA al final de la gestación podría contribuir a la disminuida sensibilidad insulínica (405-407). Se ha demostrado que un aumento en los NEFA en conejos gestantes induce el desarrollo de resistencia a la insulina (408-411). Asimismo,

los resultados obtenidos de un estudio realizado en mujeres en el segundo tercio de la gestación, a las que se infundía una solución de lípidos, revelan un aumento fisiológico de NEFA y una inhibición en un 30% de la captación de glucosa estimulada por insulina (412). Sin embargo, la resistencia a la insulina que se observa en estas mujeres, era menor que la observada en el último tercio de la gestación (413). Estos resultados sugieren que el aumento en los NEFA permite explicar en parte, pero no por completo, la resistencia a la insulina que tiene lugar en el último tercio de la gestación.

Otro factor que podría estar implicado en la resistencia a dicha hormona podría ser el aumento progresivo de los niveles circulantes de insulina, que en la segunda mitad de la gestación se sitúan en valores que representan aproximadamente el doble de los observados en la situación de no-gestación (414;415). De hecho, la estimulación prolongada con insulina en adipocitos 3T3-L1 ha demostrado inducir resistencia a la insulina por un aumento en la fosforilación en Ser(312)/Thr del IRS-1 y su posterior degradación (416;417). Sin embargo, cabe resaltar que precisamente durante la primera mitad de la gestación, aunque ya se ha desarrollado la comentada hiperinsulinemia, aún no se presenta la resistencia a la hormona (331) sino que la sensibilidad a la insulina está incluso aumentada (335). De hecho, en estas condiciones, dicha hiperinsulinemia contribuye al anabolismo en la madre durante esta fase.

Es bien conocido que la exposición de células a elevados niveles de insulina provoca una disminución en el número de receptores de insulina en la superficie celular, e incluso alteración en la afinidad de los mismos, fenómeno que ha recibido el nombre de "down regulation" (418;419). Sin embargo, en el tejido

adiposo de la rata gestante se ha demostrado que existe un aumento en la unión de la insulina a su receptor de membrana como consecuencia de un incremento en el número de receptores, y sin cambio en la afinidad de los mismos (414;415;420). De hecho, son escasos los trabajos en que se describe una disminución de los receptores (421). Además, este incremento en el número de receptores de insulina en la superficie del adipocito, no solo es consecuencia del aumento en el tamaño de la célula durante la gestación (414) sino que es también el resultado de un aumento en la concentración de los receptores en la superficie celular, ya que el número de receptores expresado por unidad de superficie está claramente aumentado en la segunda mitad de la gestación (414).

Por otro lado, al igual que ocurre con otras situaciones que cursan con resistencia a la insulina, como la obesidad o la diabetes tipo 2, la resistencia a la insulina presente al final de la gestación podría ser consecuencia de un defecto post-enlace de la insulina a su receptor. En este sentido apuntan los resultados obtenidos en biopsias de tejido adiposo subcutáneo de mujeres obesas al final de la gestación, en las cuales tanto la fosforilación como la expresión del IRS-1 se encuentran disminuidas (422;423). Otros autores han descrito una disminución en la fosforilación en tirosinas del receptor de insulina y del IRS-1 así como un aumento en la fosforilación en serinas en el músculo esquelético. Asimismo, en nuestro grupo de investigación, hemos observado que precisamente la fosforilación en la Ser307 del IRS-1 se encuentra significativamente aumentada en el tejido adiposo de la gestante a término (424). Dicha modificación bloquea la fosforilación en tirosinas del IRS-1, lo cual se traduce en un deterioro de la señal de la

insulina que se manifiesta en lugares más alejados de la cascada de la señalización como en la activación de la Akt (425).

Otra molécula que podría estar participando en los cambios en la sensibilidad a la insulina en la gestación es el PPAR γ . El PPAR γ es una molécula clave en el metabolismo lipídico, cuya actividad transcripcional se activa por ácidos grasos (426), los cuales, como se ha comentado anteriormente, se encuentran elevados en la gestación (341), y por compuestos antidiabéticos del tipo de las tiazolidinedionas (427). La importancia del PPAR γ radica en que puede ser activado por hormonas relacionadas con el metabolismo lipídico, como los glucocorticoides y la insulina, y modular la expresión de determinados genes que están relacionados con la adipogénesis y que codifican por diferentes adipoquinas implicadas en la sensibilidad a la insulina (428). Entre las adipoquinas bajo el control transcripcional del PPAR γ destacan el TNF- α , la leptina, la resistina y la adiponectina. Cabe comentar que la expresión y liberación de estas adipoquinas, a excepción de la adiponectina, normalmente se ve incrementada al aumentar la adiposidad y que la gestación es una situación en que la adiposidad materna está aumentada (429).

El TNF- α que es secretado en grandes cantidades por la placenta también podría estar participando en el desarrollo de la resistencia a la insulina en la gestación. En este sentido, se ha observado una correlación negativa entre los niveles de TNF- α y la sensibilidad a la insulina, e incluso se ha propuesto que los valores de TNF- α podrían utilizarse para predecir la resistencia a la insulina en la gestación (430). Como se ha mencionado anteriormente, el mecanismo mediante el cual el TNF- α podría disminuir la

sensibilidad a la insulina es a través de una disminución de la fosforilación en tirosinas del receptor de insulina y del IRS-1, un aumento en la fosforilación en serinas del IRS-1 y de su degradación (430) y un aumento en la secreción de NEFA.

También se ha sugerido que la leptina está implicada en el balance energético materno durante la gestación, ya que los niveles de leptina aumentan en el primer tercio de la gestación manteniéndose elevados hasta el final de la misma tanto en la mujer (430) como en la rata (431), retornando a los valores basales tras el parto. No obstante, diferentes trabajos han puesto de manifiesto que la hiperleptinemia de la gestante *per se* no se correlaciona con su respuesta insulínica (323;432)

La secreción de resistina en la gestación presenta un pico entorno a la mitad de la gestación, para luego decaer en el último tercio de la misma (433). Estos cambios en el patrón de secreción de resistina tampoco permiten explicar el aumento en la sensibilidad a la insulina en la etapa anabólica de la gestación y la disminución de la sensibilidad al final de la misma.

Finalmente, en lo que respecta a la adiponectina en la gestación, se ha descrito un aumento en la concentración sérica de adiponectina en humanos entorno a la mitad de la gestación, presentando los niveles más bajos al final de la misma (434). Esta misma tendencia ha sido corroborada en la rata por nuestro grupo de investigación (435). Las variaciones en los niveles de adiponectina se correlacionan con los cambios en el índice de masa corporal (BMI) y con los cambios en la sensibilidad a la insulina que se observan a lo largo de la gestación (436).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El último tercio de la gestación, se caracteriza por el desarrollo de hiperlipemia y resistencia a la insulina en la madre. Esta disminuida respuesta a la insulina, también parece ser la responsable de muchos de los cambios metabólicos y hormonales que acontecen durante este último tercio de la gestación, y así permite mantener un adecuado aporte de glucosa y otros nutrientes al feto.

Las TZDs son fármacos antidiabéticos que han demostrado ser herramientas muy útiles para mejorar la sensibilidad a la insulina y la hiperlipemia en otros modelos de resistencia a la insulina.

Para intentar avanzar en el conocimiento del papel de la resistencia a la insulina en la gestación en las adaptaciones metabólicas de la madre y como ello repercute en la descendencia, nos planteamos determinar la utilidad del tratamiento con englitazona durante el último tercio de la gestación como modelo de reversión de la resistencia a la insulina.

Así pues, y basándonos en los antecedentes anteriormente expuestos, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar los efectos de la administración de englitazona a ratas gestantes en la tolerancia a la glucosa y la señalización de la insulina en el tejido adiposo de la madre durante el último tercio de la gestación.
2. Analizar el efecto del tratamiento de las ratas gestantes con englitazona en el desarrollo postnatal y las consecuencias que pudiera tener a largo plazo, en la relación glucosa/insulina, la acumulación lipídica tisular, el desarrollo de obesidad, la presión arterial y la respuesta vascular de sus descendientes en la edad adulta.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Para la realización del presente trabajo se han empleado ratas Sprague-Dawley. Los animales estuvieron sometidos a ciclos de 12 horas de iluminación (a partir de las 8:00 horas) y 12 horas de oscuridad (a partir de las 20:00 horas), a una temperatura constante de $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

Los experimentos se llevaron a cabo entre las 9:00h y 9:30h de la mañana. Durante todo el tiempo los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta completa RMM [Harlan interfauna IBERICA, S.A. (Barcelona)]. Los protocolos experimentales a los que fueron sometidos los animales fueron supervisados y aprobados por el Comité Ético para la Investigación con animales de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU San Pablo.

1.1. Tratamiento de los animales

1.1.1 Experimento I.

a) El primer objetivo de este experimento fue estudiar si la englitazona (amablemente cedida por Pfizer, EEUU) podría ejercer algún efecto

sobre diferentes parámetros plasmáticos y tisulares de las ratas gestantes de 20 días.

Para ello, (figura 5) se cruzaron ratas hembras de 180-220 g de peso corporal. La edad gestacional de la rata se controló limitándose a una noche el tiempo de cohabitación de ratas vírgenes con el macho. A la mañana siguiente se separaron aquellas que en el frotis vaginal presentaban espermatozoides acompañados de células epiteliales de la vagina.

A primera hora de la mañana y durante cuatro días se administró diariamente, a partir del día 16 de gestación y hasta el día 19, y por sonda gástrica a las ratas gestantes, 50 mg de englitazona /kg de peso corporal en Tween-80 al 2% (animales tratados) o el vehículo (animales control).

El día 20 de gestación y tras dormirlos con CO_2 se sacrificaron los animales, y se recogió la sangre del cuello en tubos que contenían EDTA. A continuación, se recogió el tejido adiposo lumbar y el hígado, que se guardaron a -80°C hasta su posterior procesamiento.

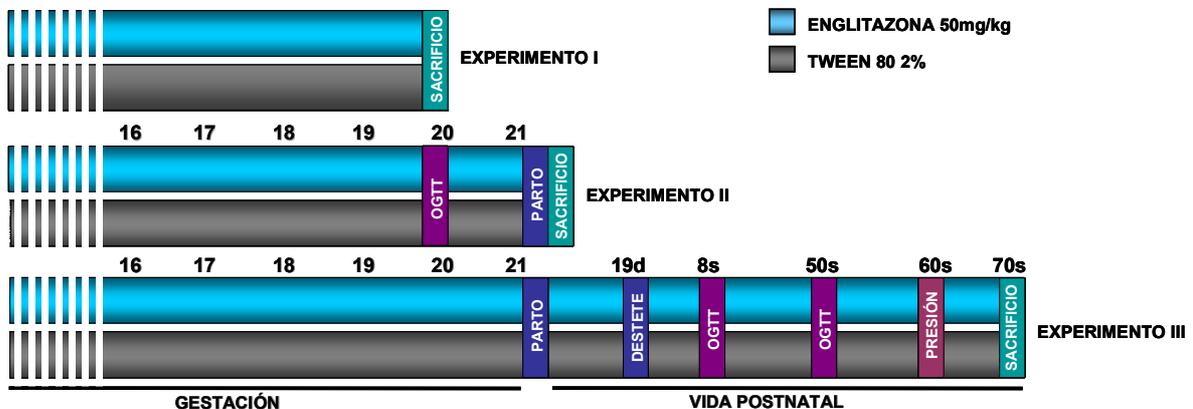


Figura 5: Diseño del tratamiento de los animales.

b) En segundo lugar, quisimos estudiar si la englitazona podría ejercer algún efecto sobre diferentes parámetros plasmáticos y tisulares de sus fetos. Para ello, los fetos fueron sacrificados por decapitación, recogiendo la sangre del cuello en tubos que contenían EDTA, así como el tejido adiposo marrón y el hígado, que se guardaron a -80°C .

1.1.2 Experimento II.

a) En primer lugar, nos propusimos evaluar el efecto de tratamiento con englitazona sobre la tolerancia oral a la glucosa de las ratas gestantes de 20 días. Con este fin, otra tanda de ratas gestantes fue tratada, también desde el día 16 de gestación con 50 mg de englitazona/kg peso corporal en Tween 80 al 2% (animales tratados) o vehículo (animales control) (**figura 5**).

El día 20 de gestación, a las 9:00 de la mañana, en ayunas y tras la obtención de una muestra de sangre de la cola para la determinación basal de la glucosa e insulina, se realizó un test de sobrecarga oral de glucosa (OGTT) tal y como se muestra en el apartado 2.2. Finalmente, se administró a las ratas el fármaco o el placebo como correspondía al 5º día de tratamiento y fueron reintegradas al experimento (ver **figura 5**).

b) En segundo lugar, evaluamos el efecto del tratamiento con englitazona de las ratas gestantes sobre diferentes parámetros plasmáticos y tisulares de los neonatos de 0,5 días. Para ello, tras el parto, los neonatos fueron sacrificados y se recogió la sangre del cuello en tubos que contenían EDTA. Asimismo, se recogió el hígado de los neonatos que se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

1.1.3 Experimento III.

Para estudiar si el tratamiento con englitazona de las ratas gestantes podría afectar a los parámetros corporales, metabólicos, hormonales y/o hemodinámicos de sus descendientes cuando son adultos, se realizó un tercer experimento en el que se trataron las ratas a partir del día 16 de gestación y durante cinco días (**figura 5**). Tras el parto, las camadas se ajustaron a 10 crías. Los neonatos sobrantes fueron sacrificados y se recogió la sangre del cuello, el hígado y el tejido adiposo marrón de los neonatos.

El día 19 de lactancia se llevó a cabo el destete de los animales y una reducción de las camadas a seis animales por grupo. Las crías sobrantes fueron sacrificadas por decapitación, recogiendo la sangre del cuello, el tejido adiposo lumbar, el tejido adiposo marrón, el hígado y el músculo esquelético.

A partir del destete las crías fueron separadas por sexos y alimentados *ad libitum* con una dieta completa RMM [Harlan interfauna IBERICA, S.A. (Barcelona)]. Los animales siguieron en observación con el fin de determinar si se producían cambios morfológicos durante su desarrollo y en el estado adulto. Asimismo, los animales fueron pesados periódicamente y se realizaron sangrados a diferentes tiempos para obtener plasma en el que se determinaron diferentes parámetros metabólicos y hormonales relacionados con el metabolismo glucídico y/o lipídico. Por otro lado, coincidiendo con las semanas 8 y 50 de vida se realizaron test de sobrecarga oral de glucosa en estos animales para estudiar su tolerancia oral a la glucosa.

En el 17º mes de vida, se llevó a cabo en los descendientes la determinación de la presión arterial mediante métodos no invasivos. Los valores de la tensión arterial sistólica,

diastólica y media se determinaron de forma indirecta en la cola de los animales como se describe más adelante en el apartado 2.4.

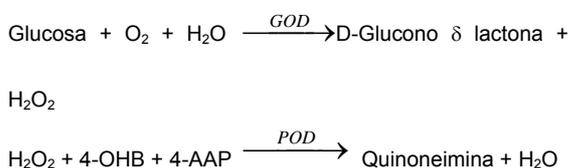
Finalmente, a los 19 meses de edad parte de los animales fueron sacrificados en ayunas mediante guillotina bajo CO₂. Tras la decapitación se recogió la sangre de cuello y se recogieron los tejidos que se guardaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. El resto de los animales fueron sacrificados tras anestesiarlos mediante la administración de pentobarbital sódico (50 mg/Kg, por vía intraperitoneal), para a continuación evaluar la reactividad vascular en el lecho mesentérico.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Parámetros plasmáticos

2.1.1 Determinación de glucosa en plasma

La glucosa se cuantificó mediante un ensayo enzimático colorimétrico utilizando el kit Unimate 7 GLUC PAP (Roche) (437), que es un sistema de diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de glucosa en suero o en plasma. La determinación se basa en las siguientes reacciones:

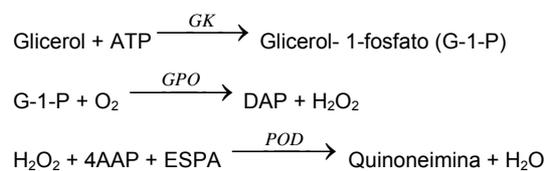


En presencia de peroxidasa (POD), el peróxido de hidrógeno que se ha formado provoca el acoplamiento oxidativo del ácido 4-hidroxibenzoico (4-OHB) y la 4-aminoantipirina (4-AAP), dando lugar a un derivado de color rojo. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración

de glucosa, y se mide colorimétricamente. La determinación se realizó en forma de microensayo, utilizando 10 µL de muestra y 250 µL de reactivo (GLUC PAP). Tras incubar, durante 10 minutos a 37° C, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Asys Hitech).

2.1.2 Determinación de glicerol en plasma

El glicerol se cuantificó mediante un sistema enzimático colorimétrico, utilizando el kit Free glycerol reagent (Sigma-Aldrich, Alemania) (438;439) basado en las siguientes reacciones:

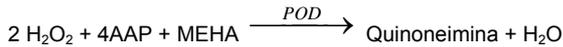
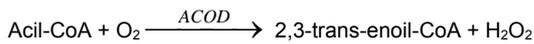


El glicerol es fosforilado en presencia de ATP, formando glicerol-1-fosfato (G-1-P) y ADP, en una reacción catalizada por la glicerol quinasa (GK). El glicerol-1-fosfato es oxidado por la glicerol fosfato oxidasa (GPO) a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Como resultado final, se produce una quinoneimina coloreada por la reacción catalizada por la peroxidasa (POD), al acoplarse a 4-aminoantipirina (4-AAP) y N-etil-N-(3-sulfopropil) m-anisidina de sodio (ESPA) con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El incremento de absorbancia a 492 nm se manifiesta con una coloración violeta y es directamente proporcional a la cantidad de glicerol en la muestra.

2.1.3 Determinación de NEFA en plasma

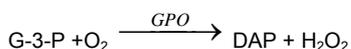
Los NEFA se cuantificaron mediante un sistema enzimático colorimétrico, utilizando el kit NEFA C ACS-ACOD Method (Wako Chemicals) basado en las siguientes reacciones:



Los NEFA (NEFA) reaccionan con Coenzima A en presencia de ATP y cationes de magnesio y por acción de la Acil-CoA sintetasa forman Acil-CoA, AMP y PPi. A continuación, el acil-CoA se oxida por acción de la acil-CoA oxidasa produciendo un 2,3-trans-enoil-CoA y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Finalmente, se produce un compuesto coloreado por la reacción catalizada por la peroxidasa (POD), al acoplarse la 4-aminoantipirina (4-AAP) y la 3-metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina (MEHA) con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El incremento de absorbancia a 492 nm es directamente proporcional a la cantidad de NEFA en la muestra.

2.1.4 Determinación de triglicéridos en plasma

Los triglicéridos plasmáticos se cuantificaron mediante un sistema enzimático colorimétrico, utilizando el kit Menagent Trinder Triglycerides (Menarini Diagnostics) basado en las siguientes reacciones:



En primer lugar, los triglicéridos son hidrolizados a glicerol y NEFA. El glicerol es fosforilado en presencia de ATP, formando glicerol-3-fosfato (G-3-P) y ADP, en una reacción catalizada por la glicerol quinasa (GK). El glicerol-3-fosfato es oxidado por la glicerol fosfato oxidasa (GPO) a dihidroxiacetona fosfato (DAP) formando peróxido de hidrógeno.

Finalmente, se produce un complejo coloreado por la reacción de la 4-aminoantipirina (4-AAP) y el ácido 3-OH 2,4,6 Triyodobenzoico (3-OH 2,4,6 TIBA) con peróxido de hidrógeno.

2.1.5 Determinación de insulina en plasma

Se valoró mediante un inmunoensayo enzimático utilizando un kit comercial para el análisis de insulina en ratas (Mercodia, Suecia), basado en la técnica directa de *sandwich* con un rango de detección 0.07-5.5 $\mu\text{g/ml}$, una variación intraensayo del 1.8% y una variación interensayo del 3.8%.

Durante la incubación, la insulina contenida en la muestra reacciona con un anticuerpo anti-insulina conjugado con peroxidasa, y con un anticuerpo anti-insulina unido directamente al pocillo de la placa microtiter. Un simple lavado provoca que el anticuerpo marcado que no se haya unido a la insulina sea eliminado, mientras que el anticuerpo conjugado con la peroxidasa que se haya unido a la insulina, es detectado por la 3, 3',5'tetrametilbencidina. La reacción se detiene por la adición de un ácido que da lugar a un compuesto coloreado que presenta su máximo de absorbancia a 450 nm. Para determinar la concentración de insulina en las muestras se utilizaron 25 μL de plasma, a los cuales se añadieron 50 μL de solución de anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina conjugado con peroxidasa. Tras incubar durante 2 horas a 20-25° C, la placa se lavó 6

veces. A continuación se añadieron 200 μ L del sustrato de la peroxidasa, y tras incubar durante 15 minutos se detuvo la reacción con H₂SO₄ 1M.

2.1.6 Determinación de leptina en plasma

Se valoró mediante un inmunoensayo enzimático utilizando un kit comercial para el análisis de leptina en ratas (Assay Designs, EEUU), basado en la técnica directa de sandwich. El rango de detección del ensayo fue 0.06-3.6 ng leptina/ml, la variación intraensayo del 11.6% y la variación interensayo del 11.0%.

Para determinar la concentración de leptina se utilizaron 100 μ L de muestra. Durante la incubación, la leptina de la muestra y de los estándares reacciona con un anticuerpo policlonal anti-leptina de rata unido directamente al pocillo de la placa *microtiter*. A continuación, se realiza una incubación con 100 μ L de un anticuerpo policlonal anti-leptina marcado con peroxidasa, que se une a la leptina capturada en la placa. El exceso del anticuerpo marcado se elimina por lavado. Así, el anticuerpo conjugado con la peroxidasa que se haya unido a la leptina, es detectado por adición de 100 μ L de TMB, mediante la reacción 3, 3',5'-tetrametilbencidina. La reacción se detiene por la adición de 100 μ L de H₂SO₄ 1M que da lugar a un compuesto coloreado que presenta su máximo de absorbancia a 450 nm.

2.1.7 Determinación de IGF-1 en plasma

Se valoró mediante un inmunoensayo enzimático competitivo utilizando un kit comercial para el análisis de IGF-1 en ratas (Rat IGF-1 EIA DRG Diagnostics). El límite de detección del ensayo fue 30 ng/ml, la variación intraensayo del 7.7% y la variación interensayo del 9.4%. El ensayo se llevó a cabo en una

placa de microtiter cuyos pocillos están tapizados con anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulina de cabra.

Primeramente, se llevó a cabo el pretratamiento de las muestras para romper las uniones del IGF-1 con las proteínas transportadoras de IGF (IGFBP). A continuación, el IGF-1 contenido en las muestras, se incubó con IGF-1 de rata marcado con biotina y un anticuerpo anti-IGF-1 de rata producido en cabra. Los anticuerpos anti-IGF-1 se unirán a los anticuerpos que se encuentran tapizando el pocillo y se va a establecer una competencia entre el IGF-1 de las muestras y el IGF-1 marcado con biotina por la unión a su anticuerpo específico. Un lavado provoca que el IGF-1 marcado que no se haya unido a su anticuerpo sea eliminado. A continuación, se realiza una incubación con estreptavidina marcada con peroxidasa, que se unirá al IGF-1 marcado con biotina. El exceso de estreptavidina-HRPO es eliminado por lavado mientras que la estreptavidina-HRPO que se haya unido al IGF-1, es detectado por la 3, 3',5'-tetrametilbencidina. La reacción se detiene por la adición de un ácido que da lugar a un compuesto coloreado. El producto coloreado formado se determina por medida de la absorbancia a 450 usando como referencia un filtro de 620 nm.

2.1.8 Determinación de adiponectina en plasma

Se valoró mediante un inmunoensayo enzimático utilizando un kit comercial para el análisis de adiponectina en rata (Assay designs, EEUU), basado en la técnica directa de *sandwich* con un rango de detección 0,05–24 μ g/ml, una variación intraensayo del 6.8% y una variación interensayo del 8.6%.

Durante la incubación, la adiponectina contenida en la muestra reacciona con un

anticuerpo anti-adiponectina policlonal unido directamente al pocillo de la placa microtiter. A continuación se produce la unión de un anticuerpo anti-adiponectina de rata conjugado con biotina. Finalmente, se adiciona estreptavidina conjugada con peroxidasa, produciéndose la unión biotina-estreptavidina. Tras una serie de lavados, se adiciona el sustrato de la reacción que es transformado por acción de la peroxidasa en un producto coloreado. La reacción se detiene por la adición de un ácido y se realiza la lectura de la absorbancia a 450nm.

2.1.9 Determinación de resistina en plasma

La resistina plasmática se valoró mediante un inmunoensayo enzimático competitivo utilizando un kit comercial para el análisis de resistina en rata (Bio Vendor, República Checa). El ensayo se llevó a cabo en una placa de microtiter cuyos pocillos están tapizados con anticuerpos de conejo anti-resistina de rata. La resistina de las muestras se une a los anticuerpos anti-resistina que se encuentran tapizando el pocillo. Después de una hora de incubación y un lavado, se adiciona un anticuerpo anti-resistina conjugado con biotina que se va a unir a la resistina capturada en el pocillo. A continuación, se realiza una incubación con estreptavidina marcada con peroxidasa, que se unirá al conjugado marcado con biotina. El exceso de estreptavidina-HRPO es eliminado por lavado mientras que la estreptavidina-HRPO que se haya unido al conjugado, es detectada por la 3, 3',5'-tetrametilbencidina. La reacción se detiene por la adición de un ácido que da lugar a un compuesto coloreado. El producto coloreado formado se determina por medida de la absorbancia a 450 nm, siendo la absorbancia proporcional a la concentración

de resistina en la muestra. El rango de detección del ensayo fue 0.05–50 ng/ml y la variación intraensayo del 5.2%.

2.2. Test de sobrecarga oral de glucosa (OGTT)

Tras un ayuno nocturno, a las 9:00 de la mañana y tras la obtención de una muestra de sangre de la cola para la determinación basal de la glucosa e insulina, se administró una dosis mediante sonda gástrica de 2 g de glucosa/kg de peso corporal. Posteriormente, se tomaron muestras de sangre de la cola a diferentes tiempos tras la administración de glucosa. La glucosa e insulina plasmáticas se determinaron tal y como se describe en los apartados 2.1.1 y 2.1.5

A partir de las curvas de glucosa e insulina se calcularon las áreas bajo la curva de glucosa (AUCG) e insulina (AUCI) hasta los 30 minutos utilizando para ello el programa Kaleidagraph versión 3.6. También se calculó el índice de sensibilidad a la insulina a partir del test de sobrecarga oral de glucosa (ISI-OGTT) (440) tal y como se describe a continuación:

$$ISI - OGTT = \frac{10000}{\sqrt{FPG \times FPI \times MG \times MI}}$$

MG: media de glucosa hasta los 60 minutos

MI: media de insulina hasta los 60 minutos

FPG: glucosa plasmática en ayunas

FPI: insulina plasmática en ayunas

2.3. Cálculo de los índices de sensibilidad a la insulina

A partir de los datos de glucosa e insulina en ayunas se calcularon otros índices que estiman la sensibilidad a la insulina como son el HOMA-IR, QUICKI, FGIR cuyas fórmulas se resumen a continuación:

$$HOMA-IR = \frac{FPG \times FPI}{2430}$$

$$QUICKI = \frac{1}{\log(FPG) + \log(FPI)}$$

$$FGIR = \frac{FPG}{FPI}$$

2.4. Presión arterial

Los valores de la tensión arterial sistólica, diastólica y media se determinaron en la cola de los animales de forma indirecta, por métodos no invasivos mediante el *LE 5002 pressure storage meter* (LETICA Scientific Instruments, España). Dicha determinación se llevó a cabo con el animal despierto, inmovilizado, aislado del ruido y tras una aclimatación de 60 minutos para favorecer la vasodilatación.

Cuando se consideró que las ratas se habían acostumbrado al proceso de medida, de forma que ello no interfiriera en la valoración correcta de este parámetro, se determinó por triplicado la presión arterial en la cola del animal con un manguito acoplado a un transductor de señales. El valor definitivo de la presión arterial fue la media aritmética de los tres valores de presión arterial en cada animal.

2.5. Estudio de la reactividad vascular en el lecho mesentérico

El día del experimento los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (50

mg/kg). La perfusión del lecho mesentérico se llevó a cabo tal y como ha sido descrito con anterioridad (441). En primer lugar se canuló la arteria mesentérica en su punto de unión con la aorta abdominal y se colocó en una rejilla de platino de un baño de órganos. El lecho mesentérico se perfundió, con la ayuda de una bomba peristáltica (Ismatec, Alemania) con un flujo constante de 3 ml/min, con una solución de Krebs-Ringer bicarbonato con la siguiente composición: NaCl 115 mM, KCl 4.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 25 mM, NaHCO₃ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, EDTA 0.01 mM y glucosa 11 mM. El medio de perfusión era previamente atemperado a 37°C y gaseado con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ que proporciona un pH final entre 7,4 y 7,6. Una vez canulado el lecho mesentérico, se mantuvo bajo un flujo de perfusión constante durante 60 minutos antes de comenzar el experimento. Para evitar interferencias en el experimento, se incluyó un sistema para la captura de las burbujas que pudieran estar presentes en el tampón de perfusión. La presión de perfusión fue determinada mediante un transductor de presiones (Grass, EEUU) y recogida mediante un polígrafo (Grass, EEUU) durante todo el experimento. Como el flujo de perfusión se mantiene constante a lo largo de los experimentos, los aumentos o disminuciones en la presión de perfusión son indicadores de la vasoconstricción o la vasodilatación del lecho mesentérico respectivamente.

2.5.1 Estudio de la respuesta a factores vasoconstrictores derivados de endotelio

En primer lugar, para valorar si el tratamiento de las gestantes con englitazona producía alteraciones en los mecanismos contráctiles del lecho de resistencia de los descendientes, se evaluó la contracción en el lecho

mesentérico inducida por KCl (75 mM), cuya acción es independiente de receptor.

A continuación, para determinar el efecto del tratamiento de las gestantes con el antidiabético sobre la respuesta inducida por agentes vasoconstrictores no derivados del endotelio en el lecho mesentérico de sus descendientes, se estudió la respuesta inducida por dos de los vasoconstrictores más importantes con acción sistémica: la angiotensina II (3×10^{-7} M) y, la noradrenalina (NA: 10^{-8} - 10^{-5} M), un agonista α_1 -adrenérgico.

2.5.2 Estudio de la respuesta vasodilatadora

a) Relajación dependiente de endotelio

Con objeto de evaluar los efectos del tratamiento de las madres con englitazona sobre la vasorrelajación dependiente de endotelio de sus descendientes, previamente al tratamiento con acetilcolina (10^{-9} - 10^{-4} M), el lecho mesentérico fue contraído con noradrenalina (NA 10^{-8} - 10^{-5} M) hasta alcanzar una contracción estable y submáxima (entre el 60-70% de la respuesta máxima), necesaria para realizar las curvas de concentración-respuesta a acetilcolina.

b) Relajación independiente de endotelio

La relajación independiente de endotelio se determinó en el lecho mesentérico precontraído con NA (10^{-8} - 10^{-5} M) mediante el tratamiento con el vasodilatador nitroprusiato sódico (NPS 10^{-12} - 10^{-5} M).

2.5.3 Estudio del efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora

Con objeto de estudiar el papel del óxido nítrico (NO) sobre la respuesta vasoconstrictora, se preincubó el lecho mesentérico durante 20 minutos en presencia

de 10^{-4} M N^G-metil-L-argininmetil ester (L-NAME) un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS) y se desarrollaron curvas de concentración-respuesta a NA (10^{-8} - 10^{-5} M).

Asimismo, para determinar el grado de contribución del NO y de los factores relajantes dependientes del endotelio (EDHF) a la relajación dependiente de acetilcolina se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta a Ach (10^{-9} - 10^{-4} M) en presencia del inhibidor L-NAME (10^{-4} M).

2.5.4 Estudio del efecto de la inhibición de canales de potasio

Con objeto de estudiar el papel del factor relajante derivado del adipocito (ADRF) sobre la relajación vascular, se incubó el lecho mesentérico durante 20 minutos con 4 aminopiridina (2mM, 4-AP) un inhibidor de los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v), bloqueando el efecto del ADRF secretado por la grasa perivascular.

2.6. Parámetros tisulares

2.6.1 Extracción de lípidos totales

Para cuantificar la cantidad de lípidos totales en los tejidos, se procedió a la extracción de los mismos mediante el método de Folch (442). Para ello, se sometió el tejido a tres extracciones sucesivas con 3 ml de una mezcla de cloroformo:metanol 2:1. El extracto lipídico obtenido de las tres extracciones se recogió en un tubo provisto de tapón de rosca y se llevó finalmente a 10 ml con cloroformo:metanol 2:1. A continuación, se lavó el extracto crudo con 2.5 ml de agua mili-Q, eliminando tras una centrifugación la fase superior formada por agua-metanol. Tras enrasar de nuevo a 10 ml con metanol se

realizaron dos lavados sucesivos utilizando en estos casos 2.5 ml de NaCl 2%.

Finalmente, tras ajustar el volumen a 10 ml con cloroformo-metanol 2:1, alícuotas de 2 ml del extracto lipídico purificado se llevaron a evaporación a vacío en un condensador. La cantidad de lípidos totales en el tejido se determinó gravimetricamente por diferencia de pesada en una balanza analítica.

2.6.2 Estudio histológico del tejido adiposo marrón.

Fijación de los tejidos

Las muestras de tejido adiposo marrón se fijaron en un tampón fosfato 0.1 M que contenía 2.5% de glutaraldehído y 2 % de paraformaldehído.

Tinción y análisis histológico

Las muestras fueron postfijadas en 1% de tetroxido de osmio y 0.8% de FeCNK en tampón fosfato. Después de una deshidratación secuencial, se cortó el tejido y las muestras fueron teñidas con azul de metilo. El análisis histológico que se presenta fue realizado por Marta Gual Soler, Facultad de Biología de la Universitat de Barcelona.

2.6.3 Western Blot e inmunodetección

a) Preparación del homogenado celular

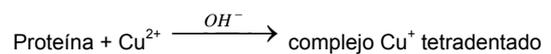
Para la preparación del homogenado celular, el tejido se disgregó y trituró en un mortero en presencia de nitrógeno líquido, evitando la descongelación de la muestra en todo momento. A continuación, se recogió la muestra en un tubo eppendorf que contenía tampón de homogenado frío (Hepes 30mM, EDTA 5mM; deoxicolato sódico 0.5%, Triton X-100 1%, y el inhibidor de proteasas Pefabloc (Roche) a una concentración final de 2mM). Tras una incubación de 15 minutos en hielo, el

homogenado se sometió a centrifugación durante 30 minutos a 17000 g y se recogió el sobrenadante, del que se separó una alícuota para la posterior cuantificación de proteínas.

b) Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico

La cuantificación de la concentración de proteínas en las muestras que contenían detergentes se llevó a cabo por el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit comercial, BCA-200 Protein Assay Kit (Pierce), ya que el método del BCA no interfiere con los detergentes presentes en el medio.

El ensayo está basado en las siguientes reacciones:



Este método combina la conocida reacción de reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por la proteína en un medio alcalino (reacción de Biuret) con una selectiva y sensible detección colorimétrica del catión Cu^+ usando para ello un reactivo que contiene ácido bicinconínico (443). El producto coloreado de la reacción está formado por dos moléculas de BCA y un ion cuproso. Este complejo, presenta un máximo de absorbancia a 562 nm que es lineal con el incremento en la concentración de proteína.

La reacción se realizó a 37° C durante 30 minutos en placas de microtiter. En cada ensayo se utilizaron 25 μL de muestra o estándar, y 200 μL del reactivo. Dicho reactivo estaba formado por las soluciones A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, reactivo de detección del BCA-200 protein assay kit, y tartrato sódico en NaOH 0.1 M) y B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 4 %), en proporción 50:1. Todos los ensayos se realizaron por duplicado,

determinando la absorbancia a 620 nm en un lector automático de placas (Asys Hightech).

c) Western Blot

Una vez determinada la concentración de proteínas en el homogenado celular, el homogenado se dividió en dos alícuotas. En una de las alícuotas se ajustó la concentración de proteína a 1 mg/mL en tampón de Laemmli (SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 5 %, tampón Tris-HCl 62.5 mM, Bromofenol azul < 0.01 %, pH 6,8) (444).

En la segunda de las alícuotas, y para llevar a cabo la determinación de resistina mediante Western Blot en condiciones no reductoras se

ajustó la concentración de proteína a 1 mg/mL con un tampón de Laemmli al que no se adicionó 2-mercaptoetanol (SDS 2 %, glicerol 10 %, tampón Tris-HCl 62,5 mM, Bromofenol azul < 0,01 %, pH 6,8).

Aproximadamente, 25µg de las proteínas celulares de las muestras se separaron por electroforesis en SDS-poliacrilamida durante 60 minutos a 25 mA, y se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Pharmacia) durante 45 minutos a 250 mA. Conjuntamente con las muestras se incluyó en el gel un marcador de peso molecular (SDS-PAGE Precision Protein Standards, Bio-Rad)

Tabla 34: Características de los anticuerpos primarios y condiciones de incubación en la inmunodetección.

Anticuerpo primario	Casa comercial	Concentración	Producido en especie	Dilución de trabajo	Condiciones de incubación
Receptor insulina	Santa Cruz	0,2 µg/µl	Conejo	1/200	30 min a T.A.
IRS-1	Upstate	1 µg/µl	Conejo	1/660	Noche a 4°C
pSer-IRS-1	Upstate	1 µg/µl	Conejo	1/10000	Noche a 4°C
IRS-2	Upstate	1 µg/µl	Conejo	1/1000	Noche a 4°C
pSer-IRS-2	Upstate	1 µg/µl	Conejo	1/1000	Noche a 4°C
PI₃K	Upstate	1 µg/µl	Conejo	1/5000	30 min a T.A.
Akt	Upstate	0,2 µg/µl	Oveja	1/350	Noche a 4°C
MAP-K	Upstate	1 µg/µl	Conejo	1/660	30 min a T.A.
PDK	Cell signalling	-	Conejo	1/500	60 min a T.A.
PTEN	Cell Signalling	-	Conejo	1/660	60 min a T.A.
Resistina	Chemicon	1 µg/µl	Conejo	1/1000	60 min a T.A.
Adiponectina	Chemicon	1 µg/µl	Conejo	1/500	60 min a T.A.
pAcetilCoA carboxilasa	Cell Signalling	-	Conejo	1/750	60 min a T.A.
β-Actina	Sigma	2,9 µg/µl	Ratón	1/5000	30 min a T.A.

Tabla 35: Características de los anticuerpos secundarios y de la estreptavidina y condiciones de incubación en la inmunodetección.

Anticuerpo secundario	Casa comercial	[Stock]	Producido en especie	Dilución de trabajo	Condiciones de incubación
Anti-IgG conejo	Sigma	-	Cabra	1/30000	30 min a T.A
Anti-IgG ratón	Chemicon	-	Cabra	1/15000	30 min a T.A
Anti-IgG oveja	Upstate	1mg/ml	Conejo	1/20000	30 min a T.A
Estreptavidina	Sigma	1mg/ml	-	1/10000	30 min a T.A

d) Inmunodetección con anticuerpos

Para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos a las membranas, éstas se incubaron en una solución de bloqueo (leche desnatada al 5% en TBST (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, Tween 0,05 % pH 8) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras la incubación con la solución de bloqueo, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo primario específico para cada una de las proteínas a detectar diluido en una solución de albúmina sérica bovina al 5% en TBST con las condiciones que se resumen en la **tabla 2**.

A continuación, se lavó la membrana 3 veces con tampón TBST y se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa en una solución de leche desnatada en TBST (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, Tween 0,05 % pH 8) al 5%, tal y como se indica en la **tabla 3**.

Finalmente, la membrana se lavó con tampón TBST durante 30 minutos. La proteína se detectó por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham) y las bandas obtenidas fueron densitometradas utilizando para ello el programa informático Molecular Analyst® Software (Bio-Rad's Image Analysis System).

2.7. Expresión de los resultados y cálculos estadísticos

Tanto en las tablas como en las figuras, los resultados se han expresado como la media de los valores obtenidos para cada grupo experimental \pm el error estándar de la media. Para determinar la homogeneidad de las varianzas entre los grupos se realizó el test de Levene. Los valores se transformaron logarítmicamente para igualar las varianzas entre las diferentes condiciones.

Las comparaciones estadísticas entre dos grupos se realizaron mediante el test *t* de Student. Las comparaciones estadísticas entre 3 o más grupos se realizaron mediante un ANOVA con los límites de confianza del 95% en ambos casos y como post-hoc se aplicó el Student-Newman Keuls.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando para ello el programa GraphPad prism 4.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

2.EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ENGLITAZONA

EN LAS RATAS GESTANTES DE 20 DÍAS

1.1. Efecto del tratamiento con englitazona sobre los parámetros corporales de las ratas gestantes de 20 días

Con el fin de determinar si existían diferencias en el peso corporal entre el grupo de ratas control y el grupo de ratas tratadas con englitazona durante la última fase de la gestación, se pesaron los animales durante todos los días que duró el experimento. Asimismo, se controló la ingesta de los animales durante los últimos días de la gestación. En la **tabla 4** se resumen los pesos de los animales a día 0, 7, 14 y 20 de gestación.

Tabla 36: Peso corporal de los animales (g).

	Control	Englitazona
Virgen	200.7 ± 3.0 a	201.3 ± 2.6 a
Gestante 7 días	234.9 ± 3.0 b	227.5 ± 6.5 b
Gestante 14 días	286.4 ± 4.4 c	273.3 ± 9.8 c
Gestante 20 días	354.1 ± 5.1 d	347.3 ± 3.7 d

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas por efecto de la gestación $p < 0.05$.

Como se muestra en la **tabla 4**, existe un incremento en el peso de las ratas a lo largo de la gestación que llega a suponer hasta el 75 % en la rata gestante de 20 días con respecto a la rata virgen. Este incremento de peso no sólo es debido a un aumento en las estructuras feto-placentarias, sino también a un incremento en los depósitos grasos de la madre, lo cual ya había sido previamente descrito (429).

Por su parte, el tratamiento con englitazona no modificó el peso corporal materno ya que tanto el peso corporal como el incremento de peso corporal y el peso libre de conceptus fueron similares (**tabla 5**).

Tampoco se observaron diferencias en la ingesta (27.5 ± 0.8 y 28.1 ± 1.0 g/día en el grupo control y englitazona respectivamente). En lo que respecta a la ingesta y el incremento de peso corporal, algunos autores han descrito que el tratamiento con troglitazona produce una disminución en los niveles de leptina y un consecuente aumento del apetito y del peso corporal (445), si bien existe discrepancia entorno a estos efectos.

Tabla 37: Incremento de peso corporal durante los días 16 al 20 de gestación y pesos tisulares.

	Control	Englitazona
Δ Peso (g)	43.0 ± 2.1	42.6 ± 3.0
Peso libre conceptus (g)	283.5 ± 3.6	275.4 ± 4.0
Tejido adiposo lumbar (g)	2.22 ± 0.15	1.74 ± 0.08 *
Hígado (g)	13.9 ± 0.2	12.9 ± 0.3 *

* $p < 0.05$ Englitazona vs Control

Por otro lado, tal y como se refleja en la **tabla 5**, tras el tratamiento con englitazona, las ratas gestantes presentaron un hígado y un tejido adiposo lumbar de menor peso de que sus correspondientes controles. La mayoría de los estudios coinciden que el tratamiento con TZDs produce el remodelamiento de la masa adiposa. Esta remodelación es consecuencia de un aumento en la diferenciación de los preadipocitos en el tejido adiposo subcutáneo, y de la apoptosis de los adipocitos hipertrofiados, tanto en los depósitos subcutáneos como en los viscerales (446). La consecuencia en último término de estos fenómenos de diferenciación y apoptosis, es un aumento en el tejido adiposo subcutáneo y una disminución en el contenido de tejido adiposo visceral. Para confirmar si la diferencia de peso de estos tejidos podría deberse a un distinto acúmulo lipídico tisular

llevamos a cabo la determinación del contenido en lípidos totales en el hígado y en el tejido adiposo lumbar.

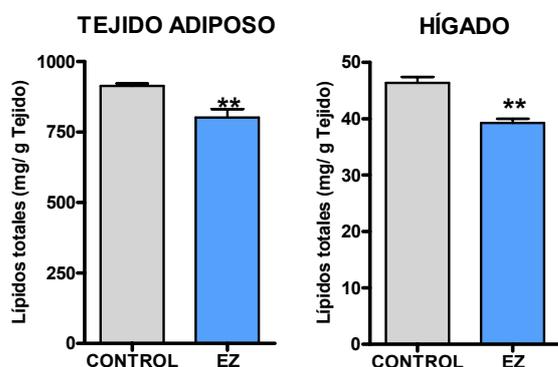


Figura 6: Contenido de lípidos totales en el tejido adiposo lumbar y en el hígado de las ratas gestantes controles y tratadas con englitazona.

** = $p < 0.01$ Englitazona vs Control

Como se refleja en la **figura 6** la extracción de lípidos totales en el tejido adiposo reveló que las ratas gestantes que recibieron englitazona presentaron un menor acúmulo lipídico en el tejido adiposo lumbar que las ratas controles. Asimismo, como se recoge también en la **figura 6** cuando se analizó el contenido de lípidos hepáticos, este fue significativamente menor en las ratas gestantes tratadas con englitazona. El tratamiento con TZDs ha demostrado tener efectos sobre el peso del hígado y el contenido de lípidos hepático. Diferentes autores han descrito que el tratamiento con rosiglitazona (447-450) y plioglitazona (451) induce una disminución en el contenido de grasa intrahepática, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en las ratas gestantes en nuestro estudio. Algunos autores han sugerido que tanto la disminución de la grasa intrahepática, como el menor contenido de grasa visceral, podrían estar relacionados con el aumento en la sensibilidad a la insulina observado tras el tratamiento con tiazolidinedionas (452). Por tanto, el menor contenido de lípidos en el tejido adiposo

visceral y en el hígado podría estar indicando una mejora en la relación glucosa-insulina en las ratas gestantes tratadas con englitazona.

1.2. Efecto del tratamiento con englitazona sobre los valores plasmáticos de las ratas gestantes de 20 días

2.1.1 Glucosa e insulina plasmáticas.

Los valores plasmáticos de glucosa e insulina de las ratas a día 20 de gestación se resumen en la **tabla 6**.

Como cabía esperar por estudios anteriores (323;338), las ratas gestantes a día 20 presentaron una ligera hipoglucemia. De esta forma, según se acerca el final de la gestación se produce una disminución de los niveles plasmáticos de glucosa en la madre, hasta llegar a ser inferiores a los de la no gestante. Esta hipoglucemia se ha observado tanto en la rata como en la mujer y es consecuencia de una mayor transferencia de sustratos desde la madre al feto (453).

Tabla 38: Concentraciones en ayunas de glucosa e insulina plasmáticas de las ratas gestantes.

	Control	Englitazona
Glucosa (mg/dL)	102.3 ± 2.9	101.4 ± 4.1
Insulina (µg/L)	1.65 ± 0.16	0.89 ± 0.11 ***

*** = $p < 0.001$ Englitazona vs Control.

En lo que respecta a las ratas gestantes tratadas con englitazona, no se observaron cambios estadísticamente significativos en los valores plasmáticos de glucosa como consecuencia del tratamiento con el antidiabético.

Existen diversos trabajos que han descrito que el tratamiento con TZDs solamente produce una disminución de los niveles plasmáticos de glucosa en individuos que presentan hiperglucemia, no afectando a la glucemia en individuos normoglucémicos pese a observarse una mejora en su respuesta a la insulina en situación basal en ambos casos (290). Estos trabajos concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que las ratas gestantes a las que se administró la englitazona, ya partían de una situación de hipoglucemia propia del final de la gestación.

En lo que respecta a los niveles de insulina plasmática, las ratas gestantes a término presentaron una marcada hiperinsulinemia en ayunas. De hecho, se conoce que los niveles de insulina van aumentando a medida que avanza la gestación y de hecho la hiperinsulinemia es también una de las características normales de la gestación tanto en la mujer (454) como en la rata (455;456). Aunque con el tratamiento con englitazona no habíamos observado ninguna modificación en

los niveles de glucosa, los niveles de insulina fueron significativamente menores en las ratas gestantes a las que se administró el antidiabético, sugiriendo una mejora en la respuesta a la insulina en los animales tratados.

2.1.2 Test de sobrecarga oral de glucosa

Para confirmar si la englitazona había sido realmente efectiva en la mejora a la respuesta a la insulina, se realizaron tests de sobrecarga oral de glucosa en las ratas gestantes de 20 días tratadas o no con englitazona. En la **figura 7** se muestran los valores de glucosa e insulina a lo largo del test de sobrecarga oral. Como se observa en la citada figura, las ratas gestantes tratadas con englitazona presentaron menores valores de glucosa e insulina a lo largo del test de sobrecarga oral que sus correspondientes controles.

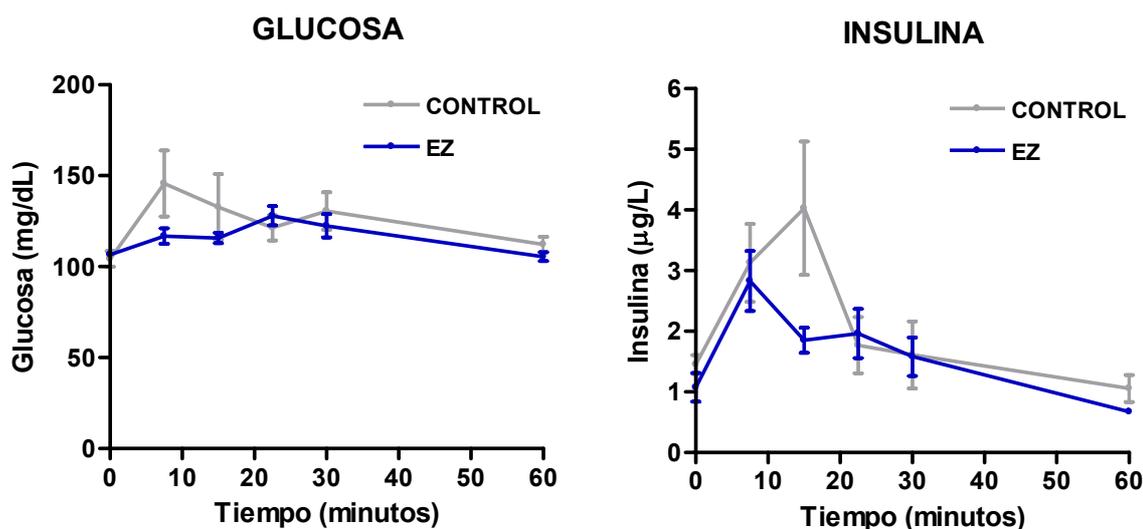


Figura 7: Glucemia e insulinemia durante el test de sobrecarga oral de glucosa en ratas gestantes de 20 días tratadas o no con englitazona.

A partir de los valores de glucosa e insulina obtenidos en el test se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) de glucosa e insulina hasta los 30 minutos. Los resultados obtenidos se resumen en la **tabla 7**.

Se observa una disminución en las AUC de glucosa e insulina en las ratas gestantes tratadas durante cuatro días con englitazona con respecto a las ratas controles. Existen autores que relacionan el producto de las áreas bajo la curva de glucosa e insulina con la sensibilidad de los tejidos a los efectos de la hormona (457). De esta forma, cuanto menor es el producto de las áreas bajo la curva de glucosa e insulina más sensibles son los tejidos a la insulina. Estos resultados sugieren una mejora en la respuesta a la insulina en los tejidos de las ratas gestantes tratadas con englitazona.

Tabla 39: Efecto del tratamiento con englitazona en las ratas gestantes en las áreas bajo la curva de glucosa e insulina.

	Control	Englitazona
AUC Glucosa 30 (u.a)	891.9 ± 194.9	359.2 ± 25.9*
AUC Insulina 30 (u.a)	1599.0 ± 346.4	794.9 ± 240.7*

* = $p < 0.05$ Englitazona vs Control

Dado que otros autores cuestionan la utilidad de las citadas áreas para confirmar la mejora en la sensibilidad a la insulina se utilizaron otros índices. Así, se calculó el índice de sensibilidad a la insulina a partir de los datos de los tests de sobrecarga oral de glucosa (440). El índice de sensibilidad a la insulina (ISI-OGTT) indica el grado de sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina. Como se puede observar en la **tabla 8**, existe un aumento en la sensibilidad a los efectos de la hormona en las ratas gestantes tratadas con

englitazona, aunque en este caso no se alcanzó la significación estadística.

Tabla 40: Efecto del tratamiento con englitazona en las ratas gestantes en los índices de sensibilidad a la insulina ISI-OGTT, HOMA-IR, QUICKI y FGIR.

	Control	Englitazona
ISI-OGTT ([$\mu\text{g/L} \times \text{mg/L}]^{-2}$)	48.66 ± 8.09	62.41 ± 13.12
HOMA-IR	1.89 ± 0.23	0.99 ± 0.21*
QUICKI	0.276 ± 0.004	0.304 ± 0.009*
FGIR ($\text{mg}/10^4\text{U}$)	3.01 ± 0.30	5.44 ± 2.62*

* = $p < 0.05$ Englitazona vs Control.

A su vez a partir de los datos de glucosa e insulina se calcularon los siguientes índices para estimar la sensibilidad a la insulina: HOMA-IR, QUICKI y FGIR, los cuales han sido validados recientemente en rata por comparación con la técnica del anclaje euglicémico-hiperinsulinémico (458). El HOMA-IR es inversamente proporcional a la sensibilidad mientras que el QUICKI y el FGIR son directamente proporcionales.

Como se recoge en la **tabla 8**, las ratas gestantes tratadas con englitazona presentaron un HOMA-IR significativamente menor y un QUICKI y FGIR significativamente mayores que las ratas gestantes controles, lo cual corrobora que la englitazona revierte el estado de resistencia a la insulina presente en la gestante a término.

2.1.3 Lípidos plasmáticos

En la **tabla 9** se muestran los valores circulantes de lípidos en las ratas gestantes tratadas o no con englitazona.

Es bien conocido que a pesar de la intensa hiperinsulinemia, el efecto antilipolítico de la insulina está disminuido debido a la resistencia a dicha hormona que acontece en el último tercio de la gestación (379;381).. Así, al final de la gestación los niveles de triglicéridos, glicerol y NEFA plasmáticos son muy elevados (323;376;377;400).

Tabla 41: Efecto del tratamiento con englitazona sobre los lípidos plasmáticos de las ratas gestantes

	Control	Englitazona
Triglicéridos (mg/dl)	268.3 ± 28.9	87.5 ± 15.1***
NEFA (µM)	1082.2 ± 128.8	650.0 ± 94.6*
Glicerol (µM)	630.3 ± 58.2	374.2 ± 34.4**

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.01$. Englitazona vs Control.

Como se observa en la **tabla 9**, los animales tratados con englitazona mostraron una marcada reducción de la hiperlipemia, ya que tanto los NEFA, el glicerol y los triglicéridos fueron significativamente menores que los de las ratas gestantes control. Esto podría ser un reflejo de la mejora en la respuesta a la insulina de la madre. Estos resultados concuerdan con los observados por otros grupos tras el tratamiento con TZDs en otras situaciones que cursan con resistencia a la insulina como la obesidad o la diabetes tipo 2 tras el tratamiento con TZDs (459).

El mecanismo por el cual las TZDs disminuyen los niveles plasmáticos de NEFA, triglicéridos y glicerol no es del todo conocido. En primer lugar, se ha descrito que los TZDs inducen la

expresión de la lipoproteína lipasa (LPL) (255) y de la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) (256), promoviendo la hidrólisis de los triglicéridos de las lipoproteínas y la captación por las células de los NEFA (460). Asimismo, se ha descrito la existencia de un transportador de glicerol en los adipocitos cuya expresión se ve inducida por el tratamiento con TZDs y que podría explicar el aumento en la captación de glicerol por los adipocitos que se ha observado tras el tratamiento con TZDs (461). Curiosamente, a pesar de la disminución de la lipemia, los depósitos grasos se encuentran disminuidos, lo que sugiere que la utilización de los mismos como sustratos energéticos podría estar aumentada.

En segundo lugar, la mejora en la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina por el tratamiento con englitazona observada en el test de sobrecarga oral de glucosa y en los índices de sensibilidad, se traduciría en un aumento en la actividad antilipolítica de la insulina, lo cual podría estar también participando en la reversión de la hiperlipemia gestacional.

Finalmente, diferentes estudios proponen que las TZDs presentan diferentes efectos en los depósitos adiposos subcutáneos y viscerales. En este sentido, el tratamiento con TZDs induce la apoptosis de los preadipocitos hipertrofiados tanto de los depósitos subcutáneos como de los viscerales. Sin embargo, las TZDs promueven la diferenciación de los preadipocitos del tejido adiposo subcutáneo y el almacenamiento lipídico preferencial en este depósito; produciendo como consecuencia una remodelación de la masa adiposa (462). Estos resultados concuerdan con los obtenidos experimentalmente, dado que las ratas gestantes tratadas con englitazona presentaron un menor contenido lipídico en el

hígado y el tejido adiposo y menos tejido adiposo lumbar que sus controles, aunque el peso corporal no se vió afectado.

2.1.4 Leptina e IGF-1 plasmáticos

La leptina es un factor mitogénico relacionado con el crecimiento y la diferenciación celulares cuyos niveles van aumentando en la madre a lo largo de la gestación, para disminuir drásticamente tras el parto (323). Existen trabajos que describen que un tratamiento crónico con TZDs produce una disminución de los niveles plasmáticos de leptina *in vivo* (463). Sin embargo, en nuestro estudio, en las ratas sometidas a tratamiento con englitazona no se observaron variaciones significativas en sus concentraciones plasmáticas de leptina con respecto a las ratas controles (**tabla 10**).

Tabla 42: Efecto del tratamiento con englitazona en la concentraciones plasmáticas de leptina e IGF-1 en las ratas a día 20 de gestación.

	Control	Englitazona
Leptina (ng/ml)	10.93 ± 2.38	11.09 ± 3.70 n.s
IGF-1 (ng/ml)	341.7 ± 27.1	367.29 ± 33.6 n.s

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1), es un factor que, al igual que la leptina e insulina, regula el crecimiento fetal y placentario. En lo que respecta a los niveles plasmáticos de IGF-1 de las ratas sometidas al tratamiento semicrónico con englitazona tampoco se observaron diferencias significativas con respecto a las ratas control.

2.1.5 Adiponectina plasmática y tisular

La adiponectina es una proteína secretada a la circulación por los adipocitos maduros y sus niveles plasmáticos parecen correlacionarse con la sensibilidad a la insulina tanto *in vivo* como *in vitro* (150), por lo que se ha propuesto como un indicador de la sensibilidad a la insulina. Los niveles de adiponectina se encuentran disminuídos en diferentes patologías que cursan con resistencia a la insulina, como son la obesidad, la diabetes y las lipodistrofias (142;154). Asimismo, en diferentes trabajos de otros grupos y del nuestro, se ha descrito que los niveles plasmáticos de adiponectina se correlacionan con los cambios en la sensibilidad a la insulina que tienen lugar a lo largo de la gestación. (464)

Dado que el tratamiento con englitazona aumenta la tolerancia a la glucosa, produce una redistribución lipídica en el organismo, disminuye la marcada hiperlipemia y aumenta la sensibilidad a la insulina de la gestante a término, quisimos estudiar si el tratamiento con englitazona tenía algún efecto sobre la secreción de adiponectina por parte del tejido adiposo.

Como se refleja en la **figura 8**, la englitazona produjo un aumento de la concentración de adiponectina plasmática a día 20 de gestación en la rata. De hecho, los valores obtenidos en las ratas preñadas tratadas con englitazona son similares a los de las ratas no gestantes sin tratamiento tal y como hemos visto en otros estudios de nuestro grupo (resultados no mostrados) (465).

Dado que habíamos observado un aumento en los niveles de adiponectina plasmática, cabría esperar un aumento en la expresión de adiponectina en el tejido adiposo de las ratas gestantes tratadas con englitazona. Por ello, estudiamos la expresión de adiponectina

mediante Western blot en el tejido adiposo lumbar de ratas gestantes controles y tratadas con englitazona. Tal y como se muestra en la **figura 8**, el tratamiento con englitazona produjo un marcado incremento en la expresión de adiponectina en el tejido adiposo de ratas gestantes.

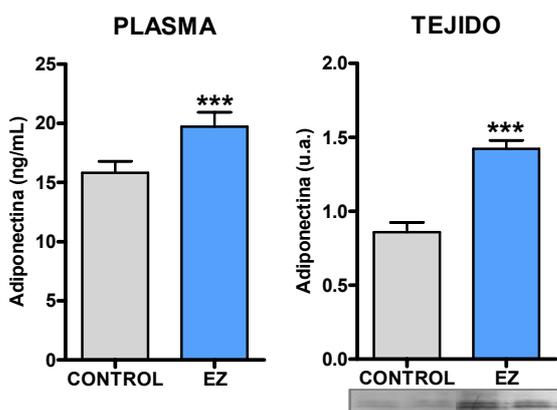


Figura 8: Efecto del tratamiento con englitazona sobre los niveles de adiponectina circulante y su expresión en el tejido adiposo de ratas gestantes a día 20 de gestación.

*** = $p < 0.001$ Englitazona vs Control.

Estos resultados concuerdan con los descritos en la literatura, ya que el tratamiento con TZDs ha demostrado aumentar la transcripción del gen de la adiponectina, su expresión y su secreción a plasma (304;305). Asimismo, se ha descrito un aumento en la sensibilidad a la insulina y un aumento en los niveles séricos de adiponectina tanto en individuos normales, como en humanos y roedores con resistencia a la insulina tras la administración de tiazolidinedionas (304;306;307). Estos efectos son dependientes del control transcripcional del receptor PPAR γ , ya que los individuos con mutaciones dominantes en el gen del PPAR γ presentan una disminución en los niveles plasmáticos de adiponectina y resistencia a la insulina (308). En este sentido, cabe destacar que resultados de nuestro grupo de

investigación apuntan a que el pretratamiento *ex vivo* de adipocitos de ratas gestantes de 20 días con adiponectina globular restaura la fosforilación en tirosinas del IRS-1 estimulada por insulina (466).

Estos resultados ponen de manifiesto que la englitazona revierte la disminución en el contenido de adiponectina circulante y tisular propios del final de la gestación, y refuerzan el papel de la disminución de la adiponectina en la menor respuesta tisular a la insulina que acontece en el último tercio de la gestación.

2.1.6 Resistina plasmática y tisular

Según los estudios de Stepan y colaboradores (119), la resistina es una citoquina secretada por los adipocitos que se encuentra presente en suero y cuyos niveles aumentan con la obesidad. El tratamiento con resistina recombinante altera la captación de glucosa mediada por insulina en ratones normales, mientras que el tratamiento con anticuerpos anti-resistina aumenta la sensibilidad a la insulina en ratones obesos y con resistencia a la insulina. Por esta razón, dichos autores postularon que esta hormona podría ser el nexo de unión entre la resistencia a la insulina y la obesidad.

Otros estudios y resultados de nuestro laboratorio evidencian que en los niveles de resistina plasmáticos a lo largo de la gestación, existe un pico entorno a la mitad de la gestación en la rata para luego decaer al final de la misma por debajo de los niveles de las no gestantes (de Castro y col.; resultados pendientes de publicación) (467). De esta forma, aunque la resistina se haya descrito como una hormona implicada en el desarrollo de la resistencia a la insulina, sus niveles no se correlacionan con los cambios en la sensibilidad a la insulina que ocurren a lo largo de la gestación, por lo que no parece ser el

origen de la resistencia a la insulina que tiene lugar en el último tercio de la misma.

Para intentar clarificar si el tratamiento con englitazona podría modular los niveles de resistina, llevamos a cabo la determinación de dicha hormona en el plasma de las ratas gestantes de 20 días. Como se observa en la **figura 9**, los niveles de resistina se encontraron disminuidos en el grupo de las ratas gestantes que habían sido tratadas con englitazona y como hemos comentado anteriormente, este efecto se vió acompañado de una mejora en su sensibilidad a la insulina.

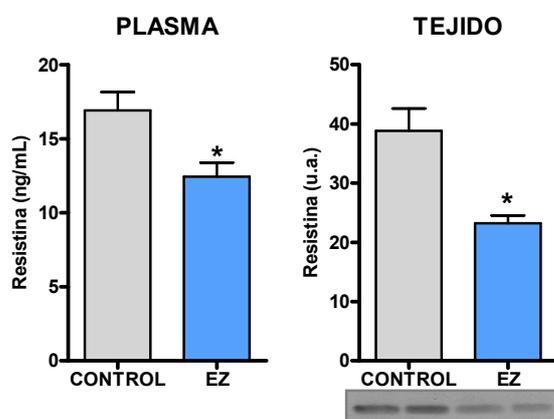


Figura 9: Efecto del tratamiento con englitazona sobre los niveles de resistina circulante y su expresión en el tejido adiposo en ratas a día 20 de gestación. * $p < 0.05$. Englitazona vs control.

Asimismo, quisimos comprobar si la disminución en los niveles plasmáticos de resistina tras el tratamiento con englitazona se debía a una disminución de su expresión por parte del tejido adiposo lumbar. Para ello, estudiamos la expresión de resistina en el tejido adiposo lumbar de las ratas gestantes tratadas con englitazona o vehículo. Tal y como se recoge en la **figura 9**, la expresión de resistina en el tejido adiposo fue significativamente menor en las ratas que fueron tratadas durante el último tercio de la

gestación con englitazona. Así pues, podemos concluir que el tratamiento con englitazona disminuye tanto la expresión de resistina en el tejido adiposo lumbar como los niveles circulantes de la hormona.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Stepan y colaboradores, que observaron una disminución en la expresión de resistina tras el tratamiento con rosiglitazona, (119). Esta disminución podría deberse a que esta hormona podría estar bajo el control transcripcional del PPAR γ . Así, algunos autores han observado que el gen de la resistina presenta varios PPRE en la región del promotor (468) y que el tratamiento con agonistas del PPAR γ , del tipo de las TZDs, disminuyen los niveles de resistina, aumentan la sensibilidad a la insulina y disminuyen el contenido de grasa intrahepática (469;470). Sin embargo, no se debe olvidar que existe bastante discrepancia entorno a los efectos de la resistina y su control transcripcional, ya que los resultados son contradictorios. Así, otros autores han observado que en el tejido adiposo de distintos modelos experimentales de diabetes y obesidad la expresión de la resistina se encuentra dramáticamente disminuida (303) y que en estos animales el efecto antidiabético de las TZDs no está mediado por la resistina (303).

A la vista de nuestros resultados, y a pesar de que el patrón de secreción de resistina a lo largo de la gestación no permita explicar los cambios en la sensibilidad a la insulina, la disminución en los niveles plasmáticos de resistina tras el tratamiento con englitazona podría estar contribuyendo a la mejora en la sensibilidad a la insulina observada en las ratas gestantes que recibieron el antidiabético.

1.3. Efecto del tratamiento con englitazona sobre la señalización de la insulina en el tejido adiposo lumbar de ratas gestantes de 20 días

Aunque en los últimos años se ha producido un importante avance en el conocimiento de los mecanismos de transducción de señales de la insulina y a pesar de que las TZDs están siendo utilizadas en clínica de forma satisfactoria para el tratamiento de diferentes patologías que cursan con resistencia a la insulina, el mecanismo molecular por el que estos fármacos mejoran la respuesta a los efectos de esta hormona aún no se conoce en su totalidad.

Dado que en el presente estudio todos los resultados sugieren que la respuesta tisular a la insulina en las ratas gestantes tras el tratamiento con englitazona podría estar aumentada, se procedió al análisis molecular de la señalización de la insulina en el tejido adiposo lumbar de las ratas gestantes controles y tratadas con englitazona para intentar clarificar los mecanismos moleculares mediados por las TZDs implicados en la señalización de dicha hormona en la gestación.

Aunque los mecanismos moleculares implicados en la mejora de la sensibilidad a la insulina tras el tratamiento con TZDs no son del todo conocidos hay cada vez más evidencias de que estos fármacos mejoran la respuesta a la insulina modulando la actividad (471) y/o la expresión (472) de las proteínas implicadas en la cascada de señalización.

Para determinar si el tratamiento con englitazona podría afectar a la expresión de las proteínas implicadas en la señalización de la insulina, se determinaron en el tejido

adiposo algunas de las proteínas más relevantes.

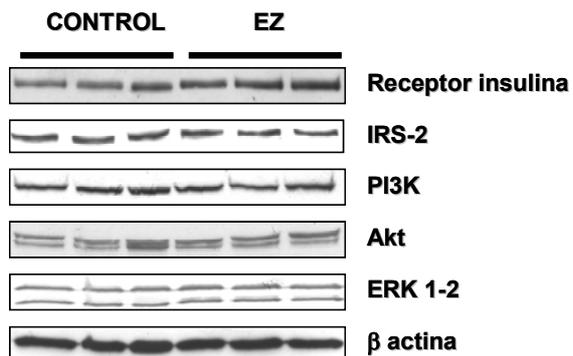


Figura 10: Expresión del receptor de insulina, IRS-2, PI₃K, Akt y ERK1-2 en el tejido adiposo de gestantes tratadas con englitazona (EZ) o vehículo (Control). Las fotografías muestran la expresión de las proteínas en el tejido adiposo de las ratas gestantes.

Tal y como se observa en la **figura 10**, no se detectaron cambios como respuesta al tratamiento con englitazona, en la expresión del receptor de insulina, IRS-2, PI₃K, Akt y ERK1-2 en el tejido adiposo de las ratas gestantes de 20 días.

Resultados recientes de nuestro grupo, sugieren una posible implicación de la fosforilación en serinas del IRS-1 en el desarrollo de la resistencia a la insulina que acontece en el último tercio de la gestación (473). Dado que el tratamiento con englitazona revierte la resistencia a la insulina en la rata gestante nos pareció un modelo adecuado para confirmar el papel de la fosforilación en serinas del IRS-1 en la modulación de dicha respuesta en la rata gestante.

Como muestra la **figura 11**, en el tejido adiposo de las ratas gestantes tratadas con englitazona disminuye la elevada fosforilación en la Ser-307 del IRS-1, sin producir cambios en la expresión de la proteína total.

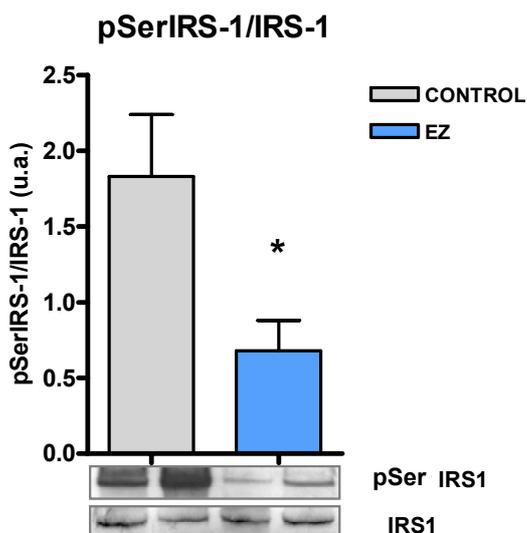


Figura 11: Fosforilación del IRS-1 en la serina 307 en el tejido adiposo de madres control y tratadas con englitazona. Las fotografías de la inmunodetección muestran la expresión del IRS-1 en el tejido adiposo (parte inferior) y la correspondiente a la pSer(307) (parte superior). * $p < 0,05$ Englitazona vs Control.

Como se indicó en la introducción, los IRS actúan como proteínas de unión entre el receptor de insulina y otras proteínas implicadas en la transducción de la señalización insulínica tras su fosforilación en tirosinas (12). Sin embargo, la activación del IRS-1 puede ser atenuada o bloqueada por modificaciones inhibitorias de la proteína, como es la fosforilación en residuos de serina. En particular la serina 307 puede ser potencialmente fosforilada por diferentes quinasas, entre las que se incluyen la PKC, JNK, mTOR, o $I\kappa\kappa\beta$, reduciendo significativamente la capacidad de los IRS de interactuar con el receptor de insulina e impidiendo la propagación de la señal dependiente de PI_3K (474).

En lo que respecta al tratamiento con TZDs, algunos autores han descrito que dichos fármacos aumentan la activación de la PI_3K y Akt mediadas por insulina en células en

cultivo, que tratamientos crónicos con troglitazona aumenta la fosforilación de la Akt estimulada por insulina en el músculo esquelético y que la rosiglitazona interfiere con la vía inhibitoria de fosforilación en serinas del IRS-1 tanto *in vitro*, como en un modelo *in vivo* de obesidad (475).

En resumen, el tratamiento de ratas gestantes con el antidiabético revierte la fosforilación en Ser-307 del IRS-1 presente en la gestante a término, lo cual se relaciona con la mejora en la sensibilidad a la insulina. Asimismo, los datos obtenidos corroboran el papel del aumento de la fosforilación en serinas del IRS-1 en el desarrollo de la resistencia a la insulina en la gestación y sugieren que la disminución en la fosforilación en la Ser-307 podría ser parte del mecanismo de acción farmacológico de las TZDs en el tratamiento de la resistencia a la insulina.

Resumen de los resultados obtenidos

A continuación se presenta un resumen de los resultados más relevantes presentados en el presente capítulo.

A pesar de que el tratamiento con englitazona no modificó la glucemia, la insulinemia fue significativamente menor en las ratas gestantes a las que se administró el antidiabético. Los resultados obtenidos en el OGTT, así como los índices de sensibilidad a la insulina (HOMA-IR QUICKI y FGIR) revelaron que la englitazona revierte el estado de resistencia a la insulina presente en la gestante a término.

Por otro lado, el tratamiento con englitazona produjo una marcada reducción de la hiperlipemia, y un menor acúmulo de lípidos en el tejido adiposo lumbar y en el hígado de las ratas gestantes. Todo lo cual podría estar relacionado con una mejora en la sensibilidad a la insulina en la madre.

Esta mejora en la respuesta a la insulina fue paralela a un aumento en la expresión y secreción de adiponectina y a una disminución en la expresión y secreción de resistina, así como de una disminución de la fosforilación en residuos de serina del IRS-1, y no de cambios en la expresión de otras proteínas de la cascada de señalización de la insulina.

CAPÍTULO II

2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ENGLITAZONA

EN LA DESCENDENCIA

2.1. Efecto del tratamiento con englitazona sobre los parámetros corporales, metabólicos y hormonales de la descendencia.

Como se ha descrito en el capítulo I, el tratamiento de las ratas gestantes con englitazona revierte la resistencia a la insulina y la hiperlipemia materna, características del último tercio de la gestación. Por ello, quisimos estudiar si el tratamiento con englitazona, bien por la reducción de la hiperlipemia y la resistencia a la insulina maternas, o bien por efecto directo del fármaco sobre las estructuras fetales, podría tener algún efecto sobre los parámetros corporales, metabólicos y hormonales de sus fetos, neonatos y crías tanto en la etapa perinatal como a largo plazo en la edad adulta.

2.1.1 Parámetros corporales, metabólicos y hormonales de fetos y neonatos.

a) Peso de los fetos y neonatos

En primer lugar, describiremos los efectos observados en fetos y neonatos. Como se puede observar en la **figura 12**, el tratamiento con englitazona produce una disminución en el peso de las crías, que ya es significativa en el momento del nacimiento. Si bien en los fetos a término ya se observa esa tendencia, la disminución no llegó a ser significativa (**figura 12**). Esta disminución en el peso corporal en los neonatos no se podría explicar por una variación en el número de animales por camada, ya que no se encontraron diferencias en el número de crías entre el grupo control y el grupo tratado (12.1 ± 0.7 y 12.2 ± 0.6 animales/camada en el grupo control y englitazona respectivamente).

Son pocos los estudios en los que se han administrado tiazolidinedionas en gestantes que aporten información acerca del efecto de estos fármacos sobre el crecimiento y desarrollo de las estructuras fetales. Existen algunos estudios en los que se ha evaluado la administración de TZDs durante la gestación, si bien estos estudios resultan contradictorios.

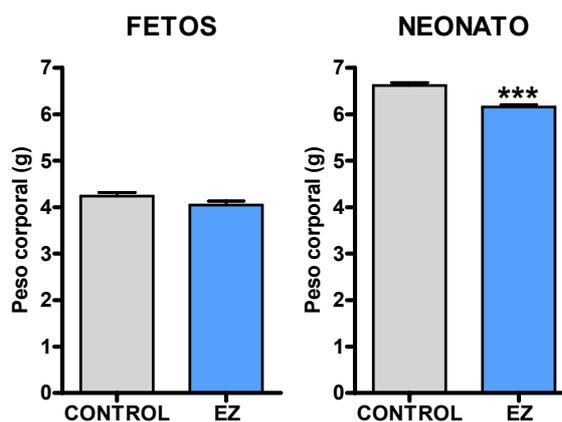


Figura 12: Efecto del tratamiento con englitazona sobre el peso corporal de fetos y neonatos. *** = $p < 0.001$ Englitazona vs Control.

Por un lado, se ha descrito que la administración de troglitazona a ratas gestantes aumenta la expresión del PPAR γ en la placenta a día 12 de gestación y disminuye la mortalidad *in utero* a día 17, sin producir ningún cambio en el peso de las estructuras feto-placentarias (476). Sin embargo, los estudios previos a la comercialización de la rosiglitazona y la pioglitazona son completamente contrapuestos. El tratamiento con dichas TZDs durante la primera mitad de la gestación parece aumentar el riesgo de mortalidad embrionaria, disminuye el crecimiento placentario y fetal y produce un retraso en el momento del parto (477).

Así, los datos obtenidos en el presente estudio están en consonancia con los obtenidos en los estudios previos a la comercialización de la pioglitazona y rosiglitazona (478) y apoyarían la hipótesis de que las TZDs podrían afectar al

correcto funcionamiento placentario y/o tener efectos sobre el desarrollo prenatal de los fetos y neonatos.

Diferentes factores podrían explicar este retraso en el crecimiento intrauterino observado en los neonatos nacidos de madres tratadas con englitazona.

En primer lugar, no se puede descartar un efecto directo del fármaco sobre los tejidos fetales. En este sentido, existen trabajos en los que se demuestra que pioglitazona y rosiglitazona son capaces de cruzar la barrera placentaria y que dicha transferencia se encuentra muy aumentada a partir del primer tercio de la gestación (479). Hasta el momento, no se ha descrito que la englitazona atraviese la placenta; sin embargo, no podemos descartar que por su similitud estructural con la pioglitazona y rosiglitazona se comporte de manera similar.

Por otro lado, es bien sabido que las alteraciones en la resistencia a la insulina que acontece de forma fisiológica en el último tercio de la gestación pueden conducir a alteraciones en el desarrollo fetal. Por una parte, se puede producir diabetes gestacional, que cursa con una disminuida secreción de insulina, intolerancia a la glucosa y macrosomía fetal. Por el contrario, si en el último tercio de la gestación no se desarrolla resistencia a la insulina, y los tejidos maternos no disminuyen su capacidad de utilización de los sustratos oxidativos, el feto no recibirá suficiente aporte de nutrientes y se producirá un retraso en el crecimiento fetal. Como hemos visto anteriormente la englitazona normaliza la resistencia a la insulina materna y por tanto, podría estar comprometiendo la llegada de glucosa al feto ya que al no desarrollar la resistencia a la insulina en la gestante a término los tejidos maternos no

disminuirían su capacidad de utilización de glucosa.

Por otro lado, la englitazona normaliza la hipertrigliceridemia materna y aunque los triglicéridos no atraviesan la placenta, el retraso en el crecimiento fetal podría ser consecuencia de las modificaciones en el metabolismo lipídico materno. De hecho, estos resultados están en concordancia con estudios previos en los que se observaba un retraso en el crecimiento intrauterino como consecuencia de reducciones en la lipemia tanto en condiciones fisiológicas y patológicas como tras el tratamiento con fármacos hipolipemiantes (480).

b) Bioquímica plasmática

Leptina e IGF1 plasmáticos

Finalmente, para intentar clarificar cuáles son las causas del retraso en el crecimiento intrauterino tras el tratamiento con englitazona, se llevaron a cabo las determinaciones de leptina y de IGF-1 plasmáticos, dos hormonas relacionadas con el crecimiento y desarrollo fetales. En primer lugar, se llevó a cabo la determinación de los niveles plasmáticos de leptina, cuyos valores están recogidos en la **tabla 11**. La leptina es un factor mitogénico que está implicado en la regulación del crecimiento, y cuya expresión puede verse regulada por el tratamiento con agonistas de los receptores PPAR γ (297;463). Sin embargo, en el presente estudio, los niveles plasmáticos de leptina no se vieron afectados por el tratamiento ni en los fetos, ni en los neonatos, a pesar de que estos últimos presentaron una disminución en el peso corporal.

Tabla 43: Efecto del tratamiento con englitazona sobre la leptina e IGF1 plasmáticos de los fetos y los neonatos.

	Fetos	
	Control	Englitazona
Leptina (ng/mL)	5.34 ± 0.56	5.03 ± 0.59
IGF-1 (ng/mL)	67.7 ± 16.0	47.8 ± 9.8

	Neonatos 0.5 días	
	Control	Control
Leptina (ng/mL)	2.72 ± 0.54	2.78 ± 0.64
IGF-1 (ng/mL)	111.2 ± 8.0	79.8 ± 9.8*

*= $p < 0.05$, Englitazona vs Control.

En la **tabla 11** también se recogen los niveles plasmáticos de IGF-1 en fetos y neonatos. Como se puede observar, cuando las madres fueron tratadas al final de la gestación con englitazona, los fetos muestran ya una tendencia a la disminución de los niveles plasmáticos del IGF-1, aunque no llegaron a observarse diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, dicha disminución en los niveles plasmáticos de IGF-1 se hizo evidente y significativa en los neonatos de madres tratadas. Como se puede observar en la **figura 13**, tanto en los fetos como en los neonatos se observó una correlación significativa entre el IGF-1 y el peso corporal.

A la vista de los resultados parece probable que dicha disminución en los niveles de IGF-1 podría estar implicada en el retraso en el crecimiento intrauterino observado en los neonatos de las madres tratadas con englitazona. Por esta razón, nos pareció interesante analizar si existía algún tipo de correlación entre los niveles de IGF-1 y el peso corporal tanto en los fetos como en los neonatos.

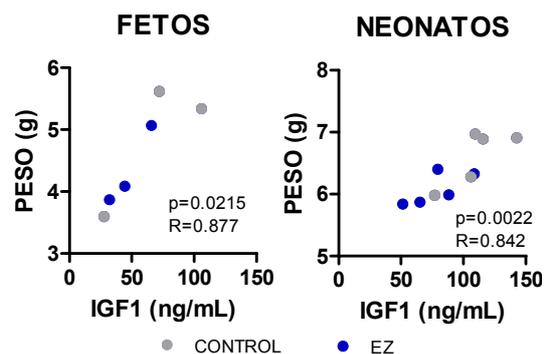


Figura 13: Correlación entre el peso corporal y la concentración de IGF-1 en fetos y neonatos. Las gráficas muestran la correlación del peso corporal frente a la concentración plasmática de IGF-1 de fetos y neonatos.

Se sabe que el IGF-1 es un factor de crecimiento sintetizado, principalmente, en el hígado en respuesta a un aumento en los niveles plasmáticos de la hormona del crecimiento (GH), cuya secreción además de control hipotalámico, se puede modular por variaciones en la glucemia. Así, la hipoglucemia induce un aumento en la secreción de GH, mientras que la hiperglucemia la disminuye (481).

Por ello, se analizaron los niveles circulantes de glucosa e insulina.

Glucosa e insulina plasmáticas

Como se muestra en la **tabla 12**, aunque no se observaron diferencias en los niveles de glucosa de los fetos de madres tratadas con englitazona respecto a los de madres control, los niveles de insulina sí que fueron significativamente más elevados en los primeros.

Sin embargo, en los neonatos nacidos de madres tratadas con englitazona tanto los niveles de glucosa como los de insulina fueron significativamente más elevados que en los nacidos de madres controles.

Tabla 44: Efecto del tratamiento con englitazona sobre los parámetros plasmáticos de los fetos y los neonatos.

	Fetos		Neonatos 0.5 días		Neonatos 1 días	
	Control	Englitazona	Control	Englitazona	Control	Englitazona
Glucosa (mg/dL)	59.5 ± 9.7	60.5 ± 7.2	88.3 ± 7.8	174.0 ± 15.7**	68.9 ± 3.5	140.8 ± 19.1 ***
Insulina(µg/L)	1.53 ± 0.10	2.16 ± 0.10**	0.44 ± 0.07	1.65 ± 0.26**	0.35 ± 0.05	0.33 ± 0.09
Triglicéridos (mg/dL)	69.4 ± 4.2	81.8 ± 4.1	101.8 ± 16.3	118.3 ± 16.1	99.4 ± 5.5	78.5 ± 6.7 *
NEFA (µM)	195.1 ± 16.3	181.1 ± 20.6	390.0 ± 49.0	545.7 ± 51.2**	779.0 ± 57.2	600.0 ± 49.9 *

*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.01$. Englitazona vs Control

Una posible explicación para este aumento de la glucemia en los neonatos podría ser una intensa glucogenolisis tras el parto, si bien no permite explicar la intensa hiperinsulinemia fetal. Por otro lado, estos resultados también permiten sugerir que el tratamiento con englitazona podría facilitar la transferencia placentaria de glucosa de la madre al feto. Esta mayor llegada de glucosa induciría una mayor secreción de insulina por el páncreas fetal para tratar de mantener los niveles de glucosa entorno a los niveles normales. Sin embargo, tras el nacimiento, parece que este mecanismo no es suficiente y la secreción de insulina por el páncreas de los neonatos es incapaz de mantener la normogluceemia. Como resultado, se produce en los neonatos hipergluceemia acompañada de hiperinsulinemia, lo cual sugiere una posible resistencia a los efectos de la insulina en estos animales. Los neonatos de un día de vida nacidos de las madres tratadas con englitazona presentaron unos niveles de glucosa en plasma significativamente superiores que los de sus respectivos controles. Sin embargo, a pesar de que los niveles de insulina en los neonatos de 0.5 días de vida del grupo tratado estaban muy incrementados, a partir del día 1 de vida no se observaron diferencias entre grupos. De esta

forma, aunque en las crías de madres tratadas los niveles de insulina se normalizan a partir del día 1 de vida, estos animales son hiperglucémicos, lo cual indica que podría persistir la intolerancia a la glucosa.

Estos resultados son paradójicos, ya que la englitazona es un fármaco utilizado en la práctica clínica por sus efectos hipoglucemiantes y sensibilizadores frente a la insulina en situaciones que cursan con resistencia a la insulina como la diabetes tipo 2 y la obesidad, y de hecho así se comporta en las gestantes tratadas con dicho fármaco (tablas 6, 7 y 8).

Dado que los fetos de las madres tratadas con englitazona poseen una glucemia normal, podríamos descartar que el retraso en el crecimiento intrauterino observado tras el tratamiento sea debido a una disminución en la disponibilidad de glucosa. No obstante, pese a tener una disponibilidad plasmática de sustratos oxidativos adecuada, los fetos de las madres tratadas con englitazona parecen estar desarrollando resistencia a la insulina y, por tanto, podrían tener una disminución en la capacidad de utilización de los mismos. No se puede descartar por tanto, que esta resistencia a la insulina pueda contribuir al retraso en el crecimiento que se observa tras el nacimiento. Asimismo, esta hipergluceemia podría ser la

responsable de una disminución de la secreción de la hormona del crecimiento, y consecuentemente ésta podría ser la causa de la menor secreción del IGF-1 por parte del hígado del neonato. De esta forma, como consecuencia de la hiperglucemia se podría estar produciendo una disminución del crecimiento intrauterino mediada por niveles disminuidos de IGF-1. Además de la glucemia e insulinemia, se llevó a cabo la determinación de diferentes parámetros lipídicos en el plasma de estos animales.

Lípidos plasmáticos

Como se observa en la **tabla 12**, los valores de triglicéridos plasmáticos de los fetos y neonatos de 0.5 días nacidos de madres tratadas con englitazona no fueron diferentes de los que presentaron sus correspondientes controles. En ambos casos, la trigliceridemia aumentó con la transición de fetos a neonatos como consecuencia de la ingesta de leche.

Aunque el contenido graso en el organismo es muy bajo en el momento del nacimiento, la transición a una dieta fundamentalmente lipídica como es el caso de la leche materna, se encontró asociada a una caída de los niveles plasmáticos de insulina y produjo un aumento en los niveles de NEFA plasmáticos en los neonatos nacidos de madres controles. Sin embargo, en los neonatos de 0.5 días nacidos de madres tratadas, el aumento en los niveles de NEFA fue incluso superior a pesar de la intensa hiperinsulinemia que presentan estos animales. Cabe destacar que un aumento tan importante en los niveles de NEFA puede producir alteraciones en la captación de glucosa mediada por insulina (402) contribuyendo de esta forma a la hiperglucemia, hiperinsulinemia y la resistencia

a la insulina (482) que presentan los animales nacidos de madres tratadas con englitazona.

Sin embargo, aunque en los neonatos de 0.5 días de vida los niveles de triglicéridos plasmáticos fueron similares entre ambos grupos, éstos se encontraban disminuidos en los neonatos de 1 día de madres tratadas. Asimismo, se detectó que los niveles plasmáticos de glicerol (387.8 ± 34.5 y 252.0 ± 45.0 μM en el grupo control y englitazona respectivamente * $p < 0.05$) fueron menores en los neonatos nacidos de madres tratadas.

Dado que los neonatos de un día de vida apenas presentan tejido adiposo blanco, la disminución en los niveles plasmáticos de NEFA observada podría tener su origen en un aumento en la oxidación de los mismos. Por otro lado, la disminución en los niveles de glicerol podría ser debida a un aumento en la captación de este sustrato por parte del hígado para favorecer la gluconeogénesis, conduciendo a una mayor producción de glucosa y contribuyendo a la hiperglucemia observada en estos animales. Finalmente, no se puede descartar que en esta disminución de las concentraciones de NEFA y glicerol circulantes, juegue un importante papel la mayor captación de los mismos y su almacenamiento en forma de triglicéridos por parte de otros tejidos.

c) Peso y contenido lipídico del hígado y tejido adiposo marrón

A continuación, nos propusimos estudiar si el tratamiento de las madres con el antidiabético podría haber ejercido algún efecto sobre el peso y/o el contenido lipídico del hígado y del tejido adiposo marrón de los neonatos a día 1 de vida.

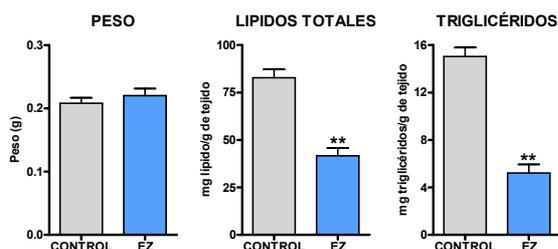


Figura 14: Efecto del tratamiento semicrónico con englitazona sobre el peso, contenido lipídico total y contenido de triglicéridos del hígado de los neonatos de un día de vida.

**= $p < 0.01$, Englitazona vs Control.

Como se recoge en la **figura 14**, no se observaron diferencias en los pesos del hígado de los neonatos de un día de vida de los grupos control y tratado. Sin embargo, el contenido en lípidos hepáticos fue significativamente menor en el caso de los neonatos nacidos de madres tratadas con englitazona. La separación de las diferentes fracciones lipídicas por cromatografía en capa fina permitió corroborar que dicha disminución se debía fundamentalmente a una disminución en el contenido de triglicéridos hepáticos.

Como se ha comentado anteriormente, cabe la posibilidad de que la englitazona esté atravesando la placenta y alcanzando el compartimento fetal y esté ejerciendo sus efectos también sobre los tejidos fetales. En este sentido, es importante destacar que las TZDs han demostrado tener un efecto directo sobre el contenido de grasa intrahepática

(483). Así, existen evidencias de que el tratamiento con TZDs produce una disminución en el contenido de grasa en el hígado, que podría ser debido a la mayor salida de triglicéridos hepáticos a la circulación y a una mayor captación de los mismos por parte del tejido adiposo (484).

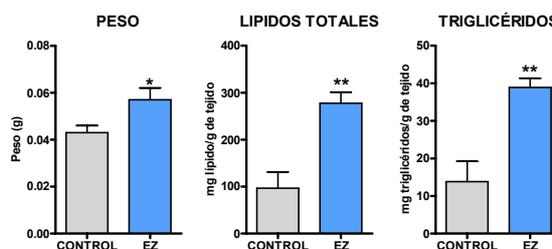


Figura 15: Efecto del tratamiento con englitazona sobre el peso, contenido lipídico total y contenido de triglicéridos del tejido adiposo marrón de los neonatos de un día de vida. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$. Englitazona vs Control.

No obstante, es bien conocido que el receptor PPAR γ , principal diana terapéutica de las TZDs, se expresa fundamentalmente en el tejido adiposo blanco (485), el cual no está completamente desarrollado en los neonatos. No obstante, existen trabajos que describen que en ausencia de tejido adiposo blanco, las tiazolidinedionas pueden ejercer su acción sobre otros tejidos (486;487).

Dado que el contenido de tejido adiposo blanco en los neonatos de un día era mínimo, nos hizo suponer que los triglicéridos hepáticos deberían estar siendo captados por otro órgano o tejido. Por esta razón nos propusimos analizar el peso y el contenido lipídico en el tejido adiposo marrón. A diferencia del blanco, la función del tejido adiposo marrón no es la de actuar como reservorio de energía, sino que presenta una función termogénica. Esta función termogénica requiere que este tejido se encuentre plenamente desarrollado en el momento del

nacimiento para poder mantener la temperatura corporal tras el parto.

La **figura 15** muestra que el tejido adiposo marrón de los neonatos de madres tratadas con englitazona fue significativamente mayor que el de los neonatos de madres control, como consecuencia de un aumento en el contenido lipídico tisular en estos animales.

Tras la separación de las diferentes fracciones lipídicas el análisis de los lípidos tisulares reflejó que el tejido adiposo marrón de estos animales presentaba un contenido de triglicéridos significativamente superior. Así pues, parece que son los triglicéridos los principales responsables de este aumento en el contenido lipídico en el tejido adiposo marrón. De hecho, por otro lado, cabe destacar que este aumento en el peso se asoció a un cambio en la apariencia del tejido, el cual presentaba un aspecto macroscópico más propio del tejido adiposo blanco.

En este sentido, los resultados recogidos en la **figura 16** evidencian que este cambio en la apariencia macroscópica del tejido adiposo marrón de los neonatos expuestos a la englitazona, es la consecuencia de un mayor

almacenamiento lipídico en el tejido.

Así, el tejido adiposo marrón de los neonatos controles está constituido por adipocitos con vacuolas multiloculares de lípidos y un elevado número de mitocondrias, mientras que en el tejido adiposo marrón de los neonatos nacidos de madres tratadas las vacuolas lipídicas fueron de un tamaño significativamente superior y el contenido de mitocondrias significativamente inferior (resultados no mostrados, pendientes de publicación).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en los que tras un tratamiento crónico a ratas con una TZD describen un aumento en el contenido lipídico en el tejido adiposo marrón, menor número de vacuolas lipídicas y vacuolas de mayor tamaño. Asimismo, en este estudio, el tejido adiposo marrón presentó un fenotipo de tejido adiposo blanco (488).

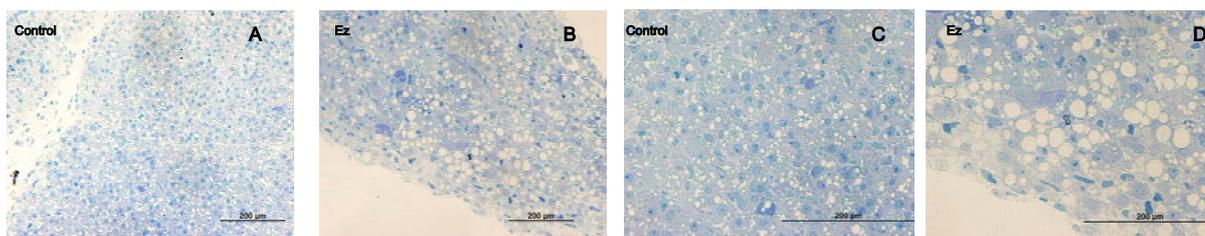


Figura 16: Imágenes de microscopía óptica del tejido adiposo marrón de fetos nacidos de madres controles (A y C) y tratadas con englitazona (B y D). Tinción con azul de metilo. Ez: Englitazona. El análisis histológico que se presenta fue realizado en la Facultad de Biología de la Universitat de Barcelona por Marta Gual Soler, y forman parte de su memoria para optar al master en biología experimental.

2.1.2 Parámetros corporales, metabólicos y hormonales en la lactancia y la vida adulta

Diferentes estudios han asociado una disminución del peso al nacimiento con el desarrollo de patologías en la edad adulta (489-491). Por ello, nos planteamos analizar directamente si existía alguna implicación de la reversión de la resistencia materna a la insulina en la programación metabólica de su descendencia.

Para este fin, se cruzaron ratas hembras Sprague-Dawley con machos control y entre los días 16 a 20 de gestación se les administró englitazona o vehículo. Las crías fueron alimentadas ad libitum y durante los 18 meses siguientes se realizó en estos animales un estudio de la evolución de sus parámetros corporales, metabólicos, hormonales y hemodinámicos que se resumen a continuación.

a) Peso corporal durante la lactancia.

Dado que habíamos observado un retraso en el crecimiento en su etapa neonatal, quisimos estudiar la evolución del peso corporal de los descendientes de madres tratadas y controles para comprobar si el retraso en el crecimiento se mantenía durante la lactancia.

En la **tabla 13** se recoge el peso corporal de las crías de madres control y tratadas con englitazona a 1, 5, 10, 15 y 19 días de edad. Así se puede observar que el peso corporal durante la lactancia fue menor en las crías de madres tratadas con englitazona. Así pues, el menor peso corporal no se recupera transcurrido el período de lactancia, ya que al tiempo del destete seguían siendo de menor peso que sus correspondientes controles.

Tabla 45: Efecto del tratamiento con englitazona sobre el peso corporal. En la tabla se recogen los pesos (en gramos) de las crías a 1, 5, 10, 15 y 19 días de edad.

	Control	Englitazona
1 día	6.7 ± 0.1	6.4 ± 0.1***
5 días	11.1 ± 0.1	10.8 ± 0.1*
10 días	20.3 ± 0.2	19.5 ± 0.3 *
15 días	30.5 ± 0.3	29.3 ± 0.4**
19 días	38.5 ± 0.3	36.6 ± 0.3***

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Englitazona vs control

La **tabla 14** recoge los pesos del tejido adiposo lumbar, del tejido adiposo marrón y del hígado. Tanto el peso del tejido adiposo lumbar, como el peso del hígado de las crías en el día 19 posnatal, fueron semejantes en ambos grupos experimentales, por lo que no se observó ningún efecto por el tratamiento de sus madres.

Tabla 46: Efecto del tratamiento con englitazona sobre el peso del tejido adiposo lumbar, del tejido adiposo marrón y del hígado de las crías en el día 19 de vida.

	Control	Englitazona
Tejido adiposo lumbar (g)	0.055 ± 0.010	0.079 ± 0.011
Tejido adiposo marrón (g)	0.167 ± 0.007	0.129 ± 0.007**
Hígado (g)	1.67 ± 0.06	1.55 ± 0.07

** = $p < 0.01$. Englitazona vs control

Sin embargo, el tejido adiposo marrón de las crías expuestas a la englitazona sacrificadas en el destete, presentó un peso significativamente menor que el de las crías nacidas de madres controles, pero no presentaba diferencias morfológicas en el momento de la disección.

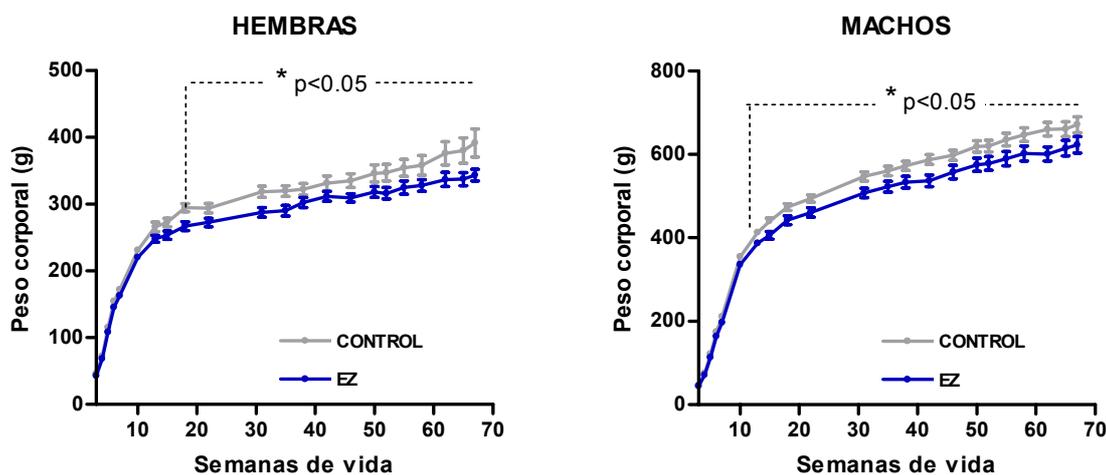


Figura 17: Efecto del tratamiento con englitazona en la gestación sobre el peso corporal de la descendencia en la edad adulta. En las figuras se representan los pesos desde el día del destete hasta la semana 70 de vida de las hembras y machos nacidos de madres controles y tratadas con englitazona.

Estos resultados nos hacen suponer que tras la suspensión del tratamiento con la englitazona, el tejido adiposo marrón deja de almacenar lípidos en su interior y recupera la actividad termogénica que le es propia.

b) Evolución del peso corporal tras la lactancia.

Tras la lactancia, se realizó el seguimiento de las crías hasta la semana 70 de vida. Durante este periodo las ratas se alimentaron con dieta control y no recibieron englitazona. Es por ello que, cualquier efecto observado debe ser bien consecuencia indirecta de los efectos de la englitazona en la madre o bien por efecto directo del fármaco sobre los tejidos fetales. Con esta finalidad, y teniendo en cuenta que tanto el crecimiento físico como los parámetros plasmáticos están muy influidos por el sexo, tras el destete se separaron las hembras de los machos y se siguió la evolución del peso corporal de las crías hasta la edad adulta. En la **figura 17** se recogen los pesos corporales de las crías hasta la semana 70 de vida. Como se puede observar, ni los machos, ni las hembras nacidas de madres tratadas con

englitazona, que mostraban un peso menor que sus respectivos controles en el destete (**tabla 13**), llegaron a alcanzar el peso de sus controles en el período estudiado.

El control de la ingesta durante 3 semanas (semanas 9-12) en estos animales reveló que tanto los machos como las hembras nacidas de madres tratadas con englitazona comían menos que sus controles (**tabla 15**).

Tabla 47: Efecto del tratamiento con englitazona de las ratas gestantes sobre la ingesta diaria de las crías durante las semanas 9-12.

(g/día)	Control	Englitazona
Hembras	22.3 ± 0.6	20.7 ± 0.3*
Machos	29.3 ± 0.3	28.0 ± 0.3**

*= $p < 0.05$, **= $p < 0.05$, Englitazona vs control

Estos datos revelan que el tratamiento de las madres con englitazona, además de retrasar el crecimiento intrauterino ha podido condicionar los mecanismos del control de la ingesta de las crías en etapas posteriores del desarrollo. Así, el tratamiento con englitazona de ratas gestantes podría estar protegiendo a sus descendientes, frente al desarrollo de obesidad cuando son adultos.

Tabla 48: Peso total y peso relativo de los tejidos de los descendientes de madres controles y tratadas con englitazona a las 70 semanas de vida.

HEMBRAS				
	Peso tejido (g)		Peso tejido/ Peso corporal (%)	
	CONTROL	EZ	CONTROL	EZ
Peso corporal	367.5 ± 35.2	311.7± 8.4*	---	---
T. adiposo lumbar	7.8 ± 2.0	5.3 ± 0.6	1.98 ± 0.28	1.69 ± 0.16
T. adiposo Mesentérico	8.1 ± 1.9	4.6 ± 0.4	2.05 ± 0.25	1.48 ± 0.09*
Hígado	8.2 ± 0.7	7.1 ± 0.3	2.26 ± 0.04	2.30 ± 0.11
T. adiposo marrón (g)	0.43 ± 0.08	0.21±0.02*	0.116 ±0.012	0.067±0.005 **

MACHOS				
	Peso tejido (g)		Peso tejido/ Peso corporal (%)	
	CONTROL	EZ	CONTROL	EZ
Peso corporal	679.2± 32.3	596..7 ± 7.5*	---	---
T. adiposo lumbar	12.9 ± 1.6	13.2 ± 1.2	1.98 ± 0.18	2.20 ± 0.15
T. adiposo mesentérico	10.8 ± 1.3	8.0± 0.5*	1.66 ± 0.09	1.33 ± 0.07*
T. adiposo epididimal	12.45 ±1.33	8.59 ± 0.47*	1.85 ± 0.12	1.46 ± 0.06*
Hígado	16.4 ± 0.8	13.0 ± 0.7**	2.46 ± 0.07	2.17 ± 0.08*
T. adiposo marrón (g)	0.54 ± 0.057	0.26 ± 0.02***	0.081±0.008	0.044±0.005 **

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ Englitazona vs control

c) Peso y contenido lipídico tisular

Existen innumerables evidencias de que un aumento en la acumulación de grasa, la cual aumenta con la edad, está ligado al desarrollo de la resistencia a la insulina. Dado que habíamos observado un menor peso corporal en los descendientes de las madres tratadas con englitazona **figura 17**, tras el sacrificio a las 70 semanas de edad se pesó el hígado, y los diferentes depósitos grasos.

Como se refleja en la **tabla 16** las hembras nacidas de madres tratadas con englitazona presentaron un menor peso corporal que sus correspondientes controles. Asimismo, estos

animales presentaron un menor contenido de tejido adiposo lumbar y de tejido adiposo mesentérico, si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, el peso del hígado fue similar entre las hembras controles y las que recibieron englitazona.

Para determinar si el menor peso de estos depósitos grasos era consecuencia de un menor desarrollo corporal o indicaba una menor adiposidad, se calculó el peso relativo de cada tejido con relación al peso corporal en cada caso, cuyos resultados se resumen en la **tabla 16**. El cálculo este cociente reveló que el peso relativo para el tejido adiposo

mesentérico y para el tejido adiposo lumbar fueron menores en los animales nacidos de las gestantes tratadas con el antidiabético. Por el contrario, no se observaron diferencias entre los dos grupos experimentales en el peso del hígado cuando éste se corregía por el peso total del animal.

En lo que respecta a los machos, los nacidos de madres que habían recibido englitazona presentaron un menor peso corporal, así como un menor peso para el hígado, el tejido adiposo epididimal y el tejido adiposo mesentérico que sus correspondientes controles. No se observaron cambios en el peso del tejido adiposo lumbar entre los animales nacidos de madres controles y los que de madres que recibieron englitazona, si bien cabe destacar que el peso relativo de este depósito fue ligeramente superior en los machos nacidos de madres tratadas.

Por último, evaluamos si el tratamiento con englitazona podría haber tenido algún efecto a largo plazo sobre el contenido de tejido adiposo marrón de los animales. Como hemos descrito anteriormente, el tratamiento con englitazona durante la etapa fetal produjo un cambio en la apariencia macroscópica del tejido (**figura 16**), así como un aumento en la acumulación de lípidos (**figura 15**) y una disminución en la expresión de marcadores de diferenciación propios del tejido adiposo marrón en los neonatos. Sin embargo, tanto en el momento del destete (**tabla 14**), como en la edad adulta, el depósito interescapular de tejido adiposo marrón en la etapa adulta (**tabla 16**) fue mucho menor en los animales nacidos de madres tratadas con englitazona.

En resumen, se podría concluir que, de forma general, el tratamiento con englitazona de las madres disminuye el contenido de los depósitos grasos en la descendencia independiente del sexo y en definitiva podría

estar protegiendo frente al desarrollo de obesidad en estos animales durante la etapa adulta.

A continuación, nos propusimos estudiar si existían diferencias en el contenido de lípidos totales en el hígado y tejido adiposo lumbar mediante extracción por el método de Folch.

Como se resume en la **tabla 17**, no se observaron diferencias en el contenido lipídico del hígado por efecto del tratamiento con englitazona de sus madres durante la gestación. Sin embargo, cuando se analizó el contenido de lípidos totales en el tejido adiposo blanco se observó una disminución del contenido en lípidos en el caso de las hembras nacidas de madres tratadas con englitazona, y por el contrario, un aumento del contenido total de lípidos en el tejido adiposo lumbar de los machos que recibieron el antidiabético.

Tabla 49: Contenido de lípidos totales del tejido adiposo e hígado de los animales nacidos de madres controles y tratadas a las 70 semanas de edad.

HEMBRAS		
(mg lípidos/g tejido)		
	CONTROL	EZ
Hígado	128.7 ± 4.6	133.9 ± 8.3
Tejido adiposo lumbar	925.9 ± 38.1	788.8 ± 50.1*
MACHOS		
(mg lípidos/g tejido)		
	CONTROL	EZ
Hígado	82.9 ± 4.5	83.9 ± 8.5
Tejido adiposo lumbar	839.0 ± 46.9	950.7 ± 11.4*

* = $p < 0.05$. Englitazona vs control

Este resultado puede resultar paradójico, ya que la exposición a un fármaco antidiabético e hipolipemiente durante la etapa perinatal fue capaz de producir efectos diferentes en la acumulación de lípidos de forma dependiente

del sexo en los animales cuando son adultos. Sin embargo, esta diferencia en el contenido lipídico permitiría explicar la disminución en el peso relativo del tejido adiposo lumbar de las hembras nacidas de madres tratadas y el incremento en el peso relativo de este tejido que se observa en los machos (**tabla 16**).

Dado que el peso y el contenido lipídico del tejido adiposo lumbar fueron diferentes entre grupos quisimos determinar si existían cambios en la actividad lipogénica en este tejido. Para ello, se llevó a cabo la determinación del contenido de acetilCoA-Carboxilasa en su forma fosforilada en el tejido adiposo lumbar de estos animales. Esta enzima en su forma desfosforilada, en la que se encuentra activa, cataliza el paso limitante de la síntesis de ácidos grasos favoreciendo la lipogénesis y el almacenamiento lipídico. Sin embargo, su fosforilación en serina mediada por la AMPK, o por la PKA en el residuo de Ser79, inhibe su actividad enzimática.

Como se observa en la **figura 18**, la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa fue significativamente mayor en el tejido adiposo lumbar de las hembras nacidas de gestantes tratadas con englitazona, lo cual determina una disminución de la actividad lipogénica del tejido adiposo lumbar de estos animales. Estos datos concuerdan con lo observado en la determinación de lípidos totales en el tejido adiposo lumbar (**tabla 17**), ya que este aumento en la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa indicaría una disminución en la lipogénesis en este tejido y podría explicar el menor contenido del lipídico del tejido adiposo lumbar en estos animales.

Por el contrario, la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa fue significativamente menor en el grupo de machos nacidos de gestantes tratadas con englitazona (**figura 19**) lo cual indicaría, de forma opuesta a lo observado en

las hembras un aumento en la lipogénesis y en el almacenamiento lipídico en el tejido adiposo lumbar en estos animales. Estos resultados permitirían explicar el mayor contenido de lípidos totales en el tejido adiposo observado en estos animales (**tabla 17**).

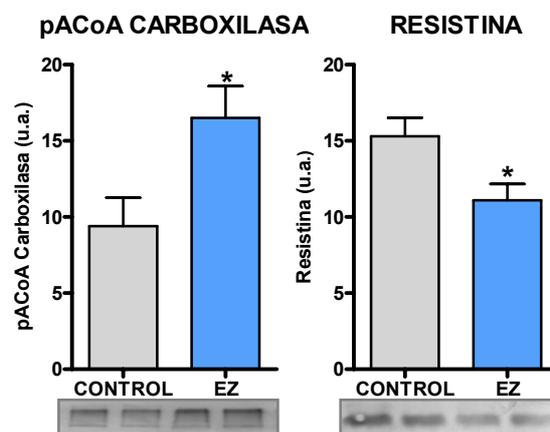


Figura 18: Fosforilación de la acetilCoA carboxilasa (serina 79) y expresión de resistina tejido adiposo lumbar de hembras de 70 semanas de vida nacidas de madres control y tratadas con englitazona. * $=p<0.05$. Englitazona vs control

Como se observa en la **figura 18**, la expresión de la resistina en el tejido adiposo lumbar se encontraba disminuida en las hembras nacidas de madres tratadas con englitazona las cuales presentaban una disminuida lipogénesis y una aumentada fosforilación de la acetilCoA carboxilasa. Por el contrario, la expresión de resistina fue mayor en el tejido adiposo lumbar de los machos tratados (**figura 19**), en el que como se muestra en la **tabla 17** la lipogénesis estaba aumentada.

Dado que la fosforilación e inactivación de la acetilCoA carboxilasa está mediada por la AMPK, una disminución en la fosforilación de la AMPK conduciría a una disminución en la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa y consecuentemente a un aumento en la actividad lipogénica de este tejido. En este

sentido, se ha descrito que el tratamiento con resistina induce una disminución en la fosforilación de la AMPK en células de músculo esquelético (492). Asimismo, otros autores han descrito una disminución en la fosforilación de la AMPK en ratas que sobreexpresan resistina (493).

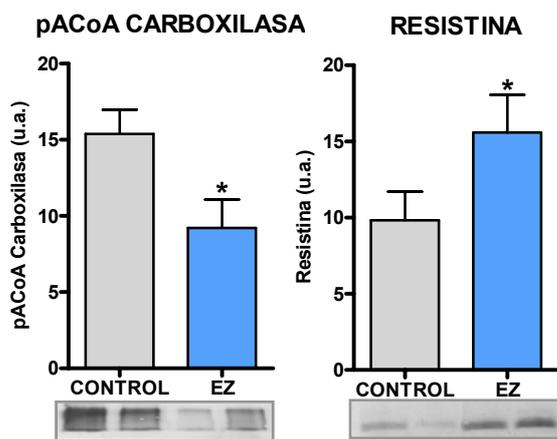


Figura 19: Fosforilación de la acetilCoA carboxilasa (serina 79) y expresión de resistina en el tejido adiposo lumbar de machos de 70 semanas de vida nacidos de madres control y tratadas con englitazona.

*= $p < 0.05$. Englitazona vs control

Dado que esta tendencia es opuesta en ambos sexos a la observada en la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa, nos propusimos estudiar si existe algún tipo de correlación entre la expresión de resistina en tejido adiposo y la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa.

La **figura 20** muestra que existe una fuerte correlación negativa entre los niveles de resistina y la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa en el tejido adiposo lumbar tanto de las hembras como de los machos. De esta forma, cuanto mayor es la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa, menores son los niveles de expresión de resistina en el tejido adiposo lumbar y viceversa.

Sería probable que mayor fosforilación de la acetilCoA carboxilasa observada en las hembras nacidas de madres tratadas sea consecuencia de una mayor fosforilación de la AMPK, como consecuencia de la menor expresión de resistina que presentan estos animales. Por el contrario, la mayor expresión de resistina en el tejido adiposo lumbar podría conducir a una menor activación de la AMPK y explicar la menor fosforilación de la acetilCoA carboxilasa en el caso de los machos nacidos de madres tratadas.

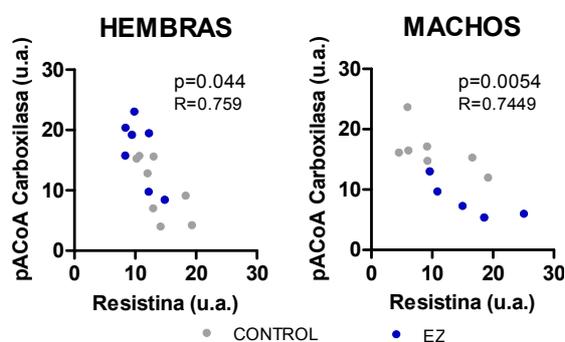


Figura 20: Correlación entre la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa y la expresión de resistina en el tejido adiposo lumbar de las hembras y machos nacidos de madres controles y tratadas con englitazona.

d) Parámetros plasmáticos en la lactancia y la edad adulta

Glucemia e insulinemia

Para estudiar si el tratamiento de las ratas gestantes con englitazona tenía algún efecto sobre sus descendientes durante su desarrollo, se llevaron a cabo las determinaciones plasmáticas de diferentes parámetros metabólicos y hormonales.

La **tabla 18** recoge los niveles de glucosa e insulina de las crías en el destete. En el día 19 de vida postnatal, los niveles plasmáticos tanto de glucosa como de insulina de las crías de madres tratadas, fueron significativamente superiores que los de las crías de madres control. De esta forma, en este momento de transición de leche materna a dieta hidrocarbonada, las crías de madres tratadas con englitazona mostraron hiperglucemia e hiperinsulinemia.

A pesar de que la secreción de insulina se encuentra incrementada, dichos niveles son insuficientes para mantener la normoglucemia.

Tabla 50: Efecto del tratamiento con englitazona de las madres sobre los parámetros metabólicos y hormonales de las crías de 19 días de vida.

	Destete (19 días)	
	Control	Englitazona
Glucosa (mg/dL)	152.1 ± 1.9	163.9 ± 4.1 *
Insulina (µg/L)	0.17 ± 0.03	0.31 ± 0.05 *
Triglicéridos (mg/dL)	52.5 ± 6.0	57.8 ± 6.6
NEFA (µM)	271.7 ± 22.5	263.8 ± 40.5
Glicerol (µM)	188.2 ± 11.2	181.8 ± 15.6

*= $p<0.05$, **= $p<0.01$; ***= $p<0.01$. Englitazona vs control

Estos resultados sugieren que la intolerancia a la glucosa y/o resistencia a la insulina observada en los neonatos de madres tratadas con englitazona podría mantenerse hasta el destete. En lo que respecta a los lípidos plasmáticos, en el momento del destete, cuyos valores se recogen también en la **tabla 18**, no se encontraron diferencias entre grupos.

Tabla 51: Efecto del tratamiento con englitazona en la gestación sobre la glucosa e insulina plasmáticas de sus descendientes.

HEMBRAS		Semanas de vida			
		11	17	22	30
Glucosa (mg/dL)	Control	124.8 ± 3.6	127.3 ± 1.5	125.2 ± 3.6	130.6 ± 4.0
	EZ	125.3 ± 3.1	128.0 ± 2.1	128.2 ± 3.2	132.9 ± 3.5
Insulina (µg/L)	Control	0.60 ± 0.13	1.11 ± 0.12	1.14 ± 0.16	0.90 ± 0.17
	EZ	0.34 ± 0.04	0.77 ± 0.06*	0.69 ± 0.08*	0.48 ± 0.09*

MACHOS		Semanas de vida			
		11	17	22	30
Glucosa (mg/dL)	Control	119.9 ± 3.2	127.3 ± 2.0	124.2 ± 3.3	119.1 ± 2.4
	EZ	117.4 ± 2.5	124.2 ± 1.6	118.8 ± 4.4	120.3 ± 2.7
Insulina (µg/L)	Control	0.79 ± 0.14	1.78 ± 0.22	1.67 ± 0.18	1.94 ± 0.21
	EZ	0.50 ± 0.12	1.26 ± 0.12	1.10 ± 0.19*	1.32 ± 0.12*

*= $p<0.05$, Englitazona vs control

Hemos descrito que las crías nacidas de ratas gestantes tratadas con englitazona presentaron alteraciones en su eje glucosa-insulina, presentando resistencia a la insulina que perduraba al menos hasta el destete.

Para estudiar si estas alteraciones en el eje glucosa-insulina se mantenían después de la lactancia, se extrajo sangre de cola periódicamente a los animales para llevar a cabo el análisis de diferentes parámetros plasmáticos. En la **tabla 19** se recogen la glucemia e insulinemia de los animales en las semanas 11, 17, 22 y 30 de vida de las hembras y los machos respectivamente.

El análisis de la glucemia en las diferentes semanas no reveló diferencias en los valores de glucosa plasmática ni en las hembras, ni en los machos nacidos de madres tratadas con englitazona, con respecto a sus correspondientes controles. Sin embargo, a pesar de que las crías nacidas de gestantes tratadas con englitazona presentaron hiperinsulinemia en su etapa fetal y neonatal que perduraba hasta el destete, a partir del periodo de lactancia los valores de insulina plasmática de las crías nacidas de madres tratadas con englitazona fueron estadísticamente menores a partir de la semana 17 en el caso de las hembras y de la 22 en el caso de los machos.

Parece pues, que tras la lactancia tanto en las hembras, como en los machos nacidos de madres tratadas con englitazona, es necesaria una menor secreción de insulina por parte del páncreas para mantener la glucemia entorno a los niveles normales. Estos resultados sugieren que estos animales ya adultos presentan una mayor tolerancia a la glucosa y mayor sensibilidad a la insulina que los animales controles.

Con el fin de hacer una estimación de la resistencia a la insulina en los animales

adultos se obtuvieron muestras de plasma en ayunas y se llevaron a cabo las determinaciones de diferentes parámetros en estos animales. Los valores se recogen en la **tabla 20**.

Al igual que se había observado en las semanas anteriores (**tabla 19**), tanto los machos como las hembras nacidos de madres tratadas con englitazona, presentaron valores de glucosa similares a los observados en los nacidos de madres controles (**tabla 20**).

Cuando se analizó la insulina plasmática observamos que como habíamos descrito con anterioridad (**tabla 19**), los niveles de insulina fueron significativamente menores tanto en las hembras, como en los machos nacidos de madres tratadas con englitazona, que en sus correspondientes controles hasta el momento del sacrificio en la semana 70 de vida (**tabla 20**).

Asimismo, a partir de los datos de glucosa e insulina se calcularon diferentes índices para estimar la sensibilidad a la insulina: HOMA-IR, QUICKI y FGIR. Como se recoge en la **tabla 20** tanto los descendientes machos como hembras de ratas gestantes tratadas con englitazona presentaron, un HOMA-IR significativamente menor y un QUICKI y FGIR significativamente mayores que los animales procedentes de gestantes controles en las semanas 8, 50 60 y 70, lo cual corrobora que el tratamiento con englitazona de sus madres induce una mayor sensibilidad a la insulina de sus descendientes cuando son adultos.

Todos estos resultados sugieren que el grupo de hembras nacidas de gestantes tratadas con englitazona presenta una mayor tolerancia a la glucosa y el deterioro que tiene lugar con la edad se encuentra retrasado.

Tabla 52: Efecto del tratamiento con englitazona sobre la glucosa e insulina plasmáticas en ayunas, HOMA-IR, QUICKI y FGIR de sus descendientes en las semanas 8, 50, 60 y 70 de vida.

Hembras		Semana 8	Semana 50	Semana 60	Semana 70
Glucosa (mg/dL)	Control	111.4 ± 4,3	104,2 ± 2.1	113,0 ± 2,9	109.9 ± 7.5
	EZ	94,5 ± 14,5 *	98,50 ± 3,7	106,2 ± 3,1	102.5 ± 2.0
Insulina (µg/L)	Control	0.042 ± 0.004	0.332 ± 0.009	0,68 ± 0,09	1.2 ± 0.2
	EZ	0.007 ± 0.001 ***	0.358 ± 0.006 *	0.41 ± 0.03 **	0.6 ± 0.1 *
HOMA	Control	0.048 ± 0.005	0.473 ± 0.083	0.83 ± 0.13	1.36 ± 0.31
	EZ	0.006 ± 0.001 ***	0.265 ± 0.030*	0.45 ± 0.04*	0.61 ± 0.07*
QUICKI	Control	0.486 ± 0.010	0.332 ± 0.009	0.301 ± 0.007	0,293 ± 0,008
	EZ	0.86 ± 0.07 ***	0.358 ± 0.006 *	0.332 ± 0.005*	0,317 ± 0,004*
FGIR	Control	110.3 ± 10.47	11.61 ± 2.58	8.05 ± 1.07	4.75 ± 0.60
	EZ	582.3 ± 79.1 ***	16.08 ± 1.93	11.09 ± 0.94 *	7.54 ± 0.84*

Machos		Semana 8	Semana 50	Semana 60	Semana 70
Glucosa (mg/dL)	Control	98.6 ± 8.2	102.0 ± 1,6	114,2 ± 1,8	109.8 ± 4.8
	EZ	102.1 ± 9,5	104.8 ± 2,6	109,9 ± 3,6	105.7 ± 8.2
Insulina (µg/L)	Control	0.233 ± 0.018	0.444 ± 0.081	1,10 ± 0,15	2.0 ± 0.2
	EZ	0.125 ± 0.072	0.264 ± 0.034*	0,73 ± 0,08*	1.2 ± 0.3 *
HOMA	Control	0.236 ± 0.018	0.745 ± 0.072	1.31 ± 0.19	2.34 ± 0.30
	EZ	0.141 ± 0.087	0.539 ± 0.056*	0.79 ± 0.08	1.25 ± 0.14*
QUICKI	Control	0.363 ± 0.004	0.308 ± 0.004	0.291 ± 0.005	0,269 ± 0,005
	EZ	0.477 ± 0.076	0.322 ± 0.004*	0.3066 ± 0.004*	0,288 ± 0,004*
FGIR	Control	17.36 ± 1.56	6.09 ± 0.72	0.666 ± 0.053	2.35 ± 0.27
	EZ	107.8 ± 67.52	8.69 ± 0.78*	0.783 ± 0.045	4,12 ± 0.88*

*= $p < 0.05$ **= $p < 0.01$, Englitazona vs control

Tests de sobrecarga oral de glucosa

Aunque los niveles de glucosa e insulina, así como los índices de resistencia a la insulina ya ponían de manifiesto que las crías nacidas de madres tratadas tenían mayor sensibilidad a la insulina, se realizaron tests de sobrecarga oral a diferentes semanas de vida.

Para la realización de los tests de sobrecarga, tras la extracción de una muestra basal de sangre de cola, se administraron 2 g de glucosa por kg de peso corporal por sondado gástrico a los animales y se extrajo sangre a diferentes tiempos después de dicha administración. Tras las determinaciones

plasmáticas de glucosa e insulina, se construyeron las curvas concentración vs tiempo de glucosa e insulina y se calcularon las áreas bajo la curva de glucosa e insulina. Para facilitar la interpretación de los resultados, también se calculó el índice de sensibilidad a la insulina a partir de los valores obtenidos en el test de sobrecarga oral de glucosa (ISI-OGTT) (440).

Para estudiar la evolución de la sensibilidad a la insulina en los descendientes, se llevaron a cabo dos tests de sobrecarga oral de glucosa en las semanas 8 y 50 de vida, cuyos resultados se describen a continuación, tanto para las hembras como para los machos.

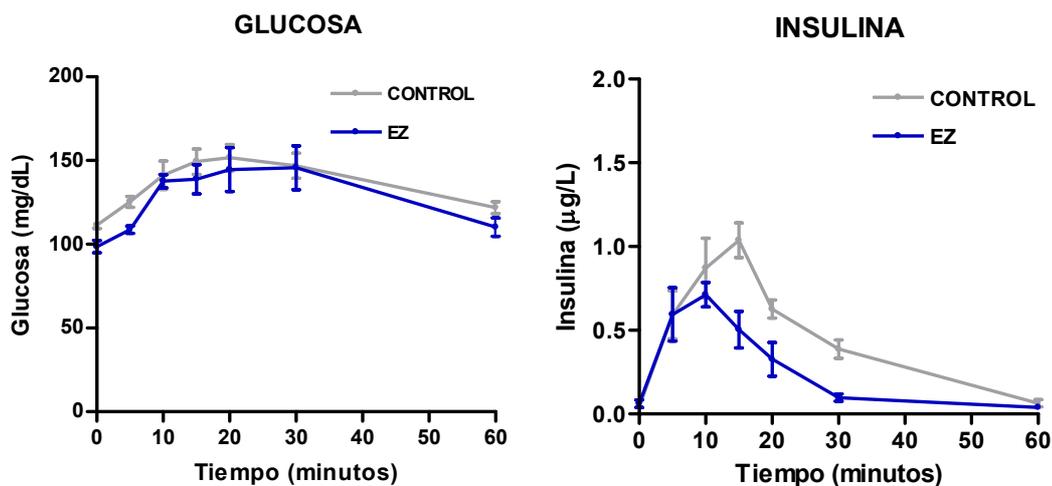


Figura 21: Curvas de glucosa e insulina durante el OGTT en la semana 8 de vida de las hembras. En ambas figuras las líneas grises representan las hembras nacidas de madres control y las azules las nacidas de madres tratadas con englitazona

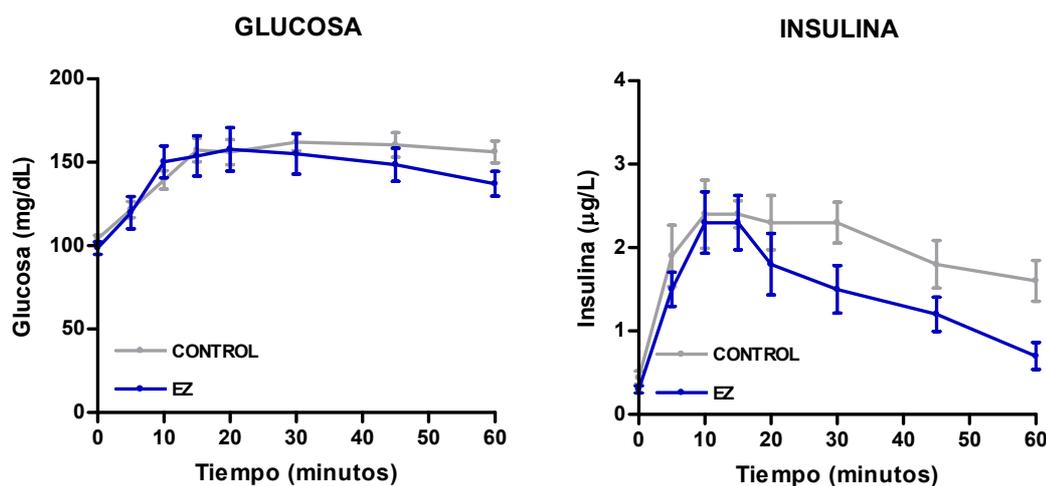


Figura 22: Curvas de glucosa e insulina durante el OGTT en la semana 50 de vida de las hembras. En ambas figuras las líneas grises representan las hembras nacidas de madres control y las azules las nacidas de madres tratadas con englitazona.

En las **figuras 21 y 22** se muestran las curvas de glucosa e insulina plasmáticas de las hembras. En ellas se muestran la media de los datos de cada grupo y el error estándar. Estas gráficas reflejan que el tratamiento de las ratas gestantes con englitazona influye en la tolerancia a la glucosa en los descendientes adultos, ya que la respuesta es diferente entre los grupos.

Como se observa en la **figura 21**, tras la sobrecarga oral de glucosa en la semana 8,

las crías hembras de ambos grupos presentaron valores similares de glucosa plasmática a lo largo del test. No obstante, cuando comparamos las curvas de insulina se aprecian claras diferencias en los valores que alcanza la insulina plasmática a lo largo del test, siendo estos valores inferiores en las crías de madres tratadas con englitazona.

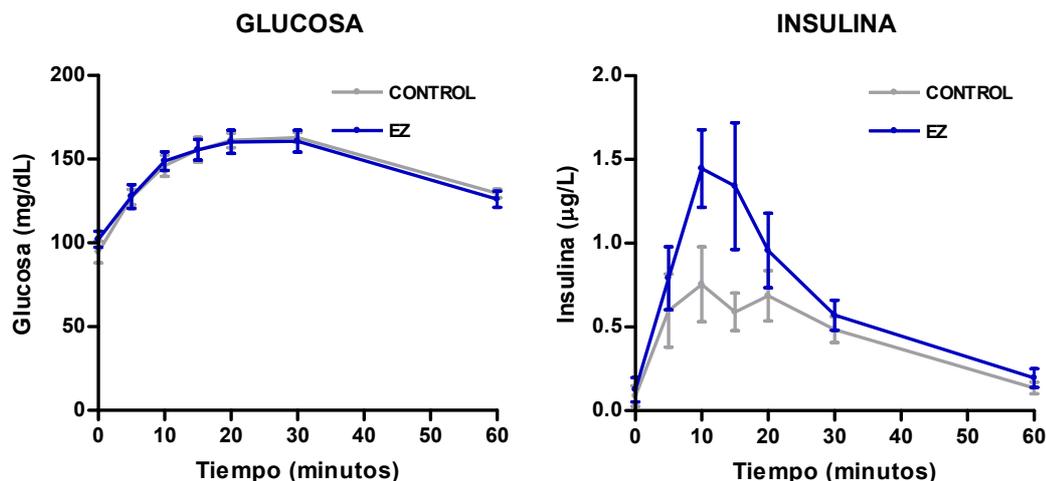


Figura 23: Curvas de glucosa e insulina durante el OGTT en la semana 8 de vida de los machos. En ambas figuras las líneas grises representan los machos nacidos de madres control y las azules los nacidos de madres tratadas con englitazona.

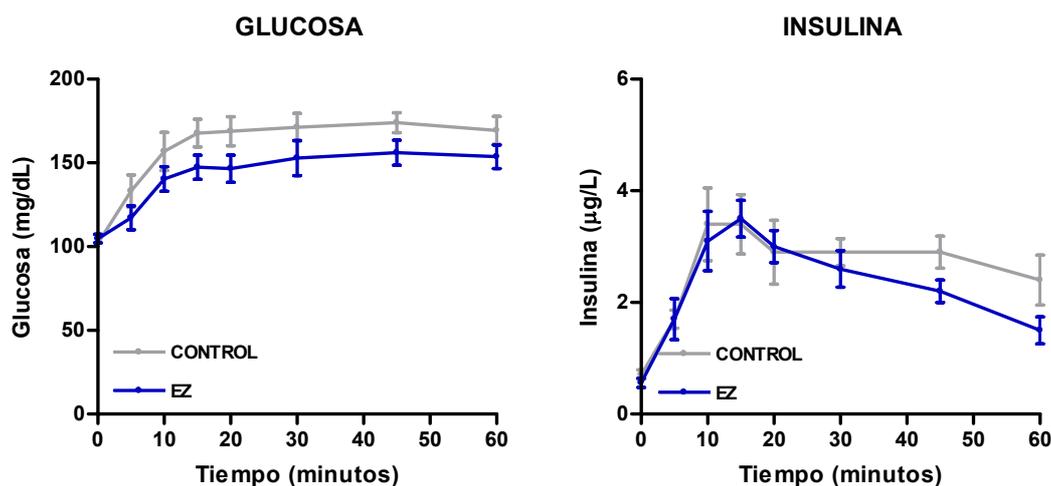


Figura 24: Curvas de glucosa e insulina durante el OGTT en la semana 50 de vida de los machos. En ambas figuras las líneas grises representan los machos nacidos de madres control y las azules los nacidos de madres tratadas con englitazona.

Del mismo modo, el análisis de las curvas de glucosa del test de sobrecarga oral en la semana 50 de vida (**figura 22**) reveló que ambos grupos mostraron valores similares de glucosa a lo largo del test de sobrecarga oral. Sin embargo, cabe destacar que de nuevo, se aprecian diferencias importantes en los niveles de insulina plasmáticos secretados como respuesta al estímulo glucémico, los cuales

fueron inferiores en las hembras nacidas de gestantes tratadas con el antidiabético.

En lo que respecta a los machos, como se observa en la **figura 23** en la semana octava de vida, los machos nacidos de madres tratadas con englitazona presentaron valores de glucosa plasmática similares a los de los machos controles.

Sin embargo, cuando comparamos las curvas de insulina (**figura 24**), los valores obtenidos fueron superiores en el grupo de machos nacidos de gestantes tratadas. Estos resultados nos están indicando que en la octava semana de vida en los machos nacidos de las gestantes tratadas con englitazona es necesaria una mayor secreción pancreática de insulina para mantener la normoglucemia y que aún perdura la intolerancia a la glucosa que se había descrito en los neonatos y en el destete.

Sin embargo, en el segundo test de sobrecarga oral de glucosa realizado en la semana 50 de vida, el análisis de las curvas de glucosa mostró que los machos nacidos de madres tratadas con englitazona presentaron por lo general menores valores de glucosa en el test de sobrecarga oral que sus correspondientes controles. Asimismo, los valores de insulina en el test de sobrecarga oral disminuyeron antes en el grupo de machos nacidos de madres tratadas con englitazona. Estos resultados sugieren que estos animales necesitan menor secreción de insulina para mantener la normoglucemia lo cual estaría reflejando una mayor sensibilidad a los efectos de dicha hormona en las etapas posteriores del desarrollo.

A partir de las curvas de glucosa e insulina tanto de las hembras como de los machos se calcularon las áreas bajo las curvas (AUC) a los 30 minutos y el índice de sensibilidad a la insulina (ISI). Cuando se analizaron las áreas bajo la curva de glucosa de los tests de sobrecarga oral de la semana 8 y 50 de vida de las hembras no se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos (**tabla 21**). Sin embargo, el estudio de las áreas bajo la curva de insulina refleja claramente que las hembras del grupo tratado presentan una mayor tolerancia tanto en la semana 8 como en la semana 50 (**tabla 21**). Así, podemos concluir que el grupo de hembras nacidas de madres tratadas con englitazona necesita una secreción pancreática de insulina menor para mantener unos valores normales de glucosa. Por su parte, el ISI reveló un claro deterioro de la sensibilidad a la insulina por efecto de la vejez en ambos grupos. A su vez, este índice reveló que las hembras nacidas de madres tratadas con englitazona presentaron una mayor sensibilidad a la insulina que las hembras controles en las dos semanas de vida en que se realizaron los test de sobrecarga oral de glucosa.

Tabla 53: Área bajo la curva de glucosa e insulina, e índice de sensibilidad a la insulina durante el OGTT en las semanas 8 y 50.

		<i>Hembras</i>		<i>Machos</i>	
		<i>Semana 8</i>	<i>Semana 50</i>	<i>Semana 8</i>	<i>Semana 50</i>
AUC Glucosa	<i>Control</i>	4230.3 ± 164.3	4336.4 ± 117.4	4405.8 ± 115.6	4667.7 ± 245.4
	<i>EZ</i>	3985.7 ± 204.1	4322.2 ± 310.0	4421.8 ± 64.86	4149.6 ± 194.4
AUC Insulina	<i>Control</i>	19.25 ± 2.45	63.3 ± 5.3	17.5 ± 1.9	80.7 ± 10.3
	<i>EZ</i>	12.1 ± 1.1*	50.0 ± 4.9 *	28.2 ± 5.4 *	78.0 ± 4.8
ISI OGTT	<i>Control</i>	539.4 ± 59.0	92.2 ± 9.5	1085.8 ± 362.8	61.9 ± 5.1
	<i>EZ</i>	792.3 ± 63.1*	149.8 ± 15.0 *	505.6 ± 178.9	76.4 ± 6.0 *

*= $p < 0.05$ Englitazona vs Control

Finalmente, los resultados obtenidos para el OGTT de la octava semana indican que el grupo de machos nacidos de las gestantes tratadas con englitazona, mostraron un aumento en el AUC insulina a pesar de no existir cambios en el AUC de glucosa (**tabla 21**). Estos resultados sugieren de nuevo una intolerancia a la glucosa. Asimismo, pese a no encontrarse diferencias estadísticamente significativas, el ISI fue menor en los machos nacidos de madres tratadas con englitazona, lo cual sugiere una menor respuesta tisular a la insulina en la octava semana de vida en los machos descendientes de gestantes tratadas. En la semana 50, no se observaron diferencias en el área bajo la curva de insulina, ni en el área bajo la curva de la glucosa (**tabla 21**). Sin embargo, el ISI fue significativamente mayor en los machos nacidos de madres tratadas con englitazona, lo cual indica que estos animales tienen mayor sensibilidad a la insulina que los machos de madres controles. En conjunto, los resultados obtenidos a partir de los test de sobrecarga oral pondrían de manifiesto que el tratamiento con englitazona de ratas gestantes podría afectar a la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina de sus descendientes machos en etapas posteriores de su desarrollo. Aunque, inicialmente los machos nacidos de madres tratadas perduraba la intolerancia a la glucosa descrita tras el parto y en la lactancia, dicha respuesta mejora en la semana 50 de vida. Como consecuencia, parece probable que el tratamiento con englitazona de sus madres podría estar protegiendo a estos animales frente al deterioro de la sensibilidad a la insulina que aparece en la vejez y que es especialmente marcada en el caso de los machos.

En resumen, podemos concluir que los resultados de los test de sobrecarga oral

confirman que el tratamiento con englitazona de las ratas gestantes afecta de forma clara a la sensibilidad a la insulina de sus crías. Aunque el tratamiento produjo una marcada intolerancia a la glucosa tras el parto que perdura por lo menos hasta el destete, tras el destete se produce un reajuste en el eje glucosa-insulina que conduce a una mayor sensibilidad a la insulina en la edad adulta.

Cabe destacar, que todos estos resultados confirman los obtenidos en las determinaciones basales de los niveles de glucosa e insulina plasmáticas que sugerían que era necesaria una menor secreción de dicha hormona en las crías nacidas de madres tratadas con englitazona para mantener la normoglucemia.

Es bien conocido que alteraciones en la nutrición fetal pueden conducir a una programación del metabolismo y tener consecuencias en la vida adulta. En particular, se ha descrito que el ambiente intrauterino puede tener consecuencias en la relación glucosa/insulina de sus crías cuando son adultas (494). El tratamiento con englitazona produce la reversión de la resistencia a la insulina en la rata gestante, lo cual puede traducirse en una cierta "subnutrición fetal" por una menor llegada de sustratos al feto. Por estas razones no se puede descartar que la mayor sensibilidad a la insulina observada en estos animales sea consecuencia de una programación del eje insulina/glucosa durante la etapa fetal, bien por efecto directo del fármaco sobre los tejidos fetales o bien por los cambios en el metabolismo materno.

Parámetros lipídicos durante el desarrollo

Otros parámetros cuyo análisis presentaba gran interés fueron los lípidos plasmáticos. Como se puede observar en la **tabla 23**, en todas las semanas de vida estudiadas, la concentración de triglicéridos plasmáticos fue menor en las hembras nacidas de madres tratadas con englitazona, que en sus respectivas controles. En el caso de los machos, los niveles de triglicéridos plasmáticos no fueron significativamente

menores que sus correspondientes controles hasta la semana 17 de vida. Los valores de los NEFA plasmáticos fueron también menores en los descendientes machos y hembras nacidas de madres tratadas con englitazona que en sus respectivos controles. Sin embargo, mientras que el glicerol fue menor en las hembras de madres tratadas con englitazona, en los machos nacidos de madres tratadas con englitazona no se apreciaron diferencias hasta la semana 30 de vida.

Tabla 54: Efecto del tratamiento con englitazona en la gestación sobre los parámetros lipídicos de sus crías a las semanas 11, 17, 22 y 30.

		HEMBRAS	Semana 11	Semana 17	Semana 22	Semana 30
NEFA (mM)	Control		0.38 ± 0.03	0.55 ± 0.06	0.53 ± 0.07	0.65 ± 0.05
	EZ		0.30 ± 0.04**	0.35 ± 0.03*	0.33 ± 0.05*	0.55 ± 0.03*
Glicerol (μM)	Control		267.7 ± 21.1	255.5 ± 27.1	381.6 ± 18.3	253.5 ± 18.5
	EZ		162.4 ± 15.0**	169.3 ± 9.3*	313.7 ± 21.9*	198.8 ± 11.5*
Triglicéridos (mg/dL)	Control		95.0 ± 5.5	102.5 ± 9.8	97.4 ± 7.1	110.4 ± 5.5
	EZ		57.0 ± 4.6***	78.5 ± 5.7	69.8 ± 4.4*	91.2 ± 6.6*
		MACHOS	Semana 11	Semana 17	Semana 22	Semana 30
NEFA (mM)	Control		0.28 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.55 ± 0.03
	EZ		0.31 ± 0.03	0.35 ± 0.02***	0.29 ± 0.02*	0.46 ± 0.03*
Glicerol (μM)	Control		197.3 ± 18.9	166.3 ± 13.2	293.7 ± 11.8	217.5 ± 15.3
	EZ		200.7 ± 28.9	181.6 ± 11.2	317.6 ± 11.9	175.0 ± 12.8*
Triglicéridos (mg/dL)	Control		118.5 ± 7.5	108.2 ± 2.1	106.6 ± 5.4	131.6 ± 9.5
	EZ		121.5 ± 4.5	91.5 ± 5.0**	95.0 ± 4.6	104.3 ± 5.3*

*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001 Englitazona vs Control

Tabla 55: Efecto del tratamiento con englitazona en la gestación sobre los parámetros lipídicos en ayunas de las crías a las semanas 60 y 70 de vida.

		Hembras		Machos	
		Semana 60	Semana 70	Semana 60	Semana 70
NEFA (mM)	Control	1.54 ± 0.06	1.12 ± 0.09	0.94 ± 0.05	0.89 ± 0.04
	EZ	1.27 ± 0.03*	0.89 ± 0.03*	0.97 ± 0.05	0.64 ± 0.07*
Glicerol (μM)	Control	560.6 ± 14.0	614.9 ± 61.7	673.4 ± 46.3	454.0 ± 16.5
	EZ	451.3 ± 30.8*	417.7 ± 39.0*	517.1 ± 36.1*	348.6 ± 36.7*
Triglicéridos (mg/dL)	Control	169.3 ± 12.5	114.8 ± 21.9	196.0 ± 12.5	175.0 ± 20.0
	EZ	126.9 ± 13.4*	57.2 ± 5.6*	161.1 ± 7.8*	104.0 ± 12.6*

*=p<0.05, Englitazona vs Control

En la **tabla 24** se recogen las determinaciones de los lípidos plasmáticos tras un periodo de

ayuno en las semanas 60 y 70 de vida. El ayuno indujo un consecuente aumento en la

actividad lipolítica del tejido adiposo (**tabla 24**), lo cual se traduce en un aumento general en los niveles plasmáticos de los NEFA y glicerol si se comparan con los datos de semanas anteriores reflejados en la **tabla 23**. Cabe destacar que tanto en hembras como en machos nacidos de madres tratadas con englitazona, todos los parámetros lipídicos fueron por lo general, significativamente menores que en los animales nacidos de madres controles.

Además de presentar un retraso en el deterioro de la sensibilidad a la insulina propio de la edad, las crías de madres tratadas con englitazona presentaron un aumento en la lipemia por la edad más retrasado que las controles. Como se puede ver en la **tabla 24**, los niveles circulantes de NEFA, glicerol y de triglicéridos fueron significativamente menores en las crías nacidas de madres tratadas con

englitazona. Este efecto se mantiene hasta el final del experimento ya que, aunque se aprecia un aumento en los niveles de lípidos circulantes con la edad, los niveles lipídicos fueron significativamente menores en los descendientes de madres tratadas con englitazona. Estos resultados permiten sugerir que el tratamiento de las gestantes con englitazona podría proteger a sus descendientes frente al desarrollo de hiperlipemia cuando son adultos. Asimismo, puesto que se conoce que elevados niveles de NEFA (401;402) y glicerol (403) están muy implicados en la patogénesis de la resistencia a la insulina, los menores niveles de estos metabolitos en el plasma podría contribuir a la mayor sensibilidad a la insulina observada en estos animales.

2.2. Caracterización molecular en la descendencia del efecto sobre la señalización de la insulina del tratamiento con englitazona a las ratas gestantes

Como se ha ido presentando, los animales nacidos de madres tratadas con englitazona presentaron una mayor tolerancia oral a la glucosa y menores niveles de insulina y lípidos plasmáticos. Por ello, para estudiar más a fondo cómo se encuentra la respuesta tisular a la insulina, llevamos a cabo el estudio molecular de la cascada de señalización de dicha hormona en el músculo esquelético y en el tejido adiposo de los descendientes de madres tratadas y controles.

2.2.1 Músculo esquelético

a) Hembras

En primer lugar, analizamos la expresión del receptor de insulina, de la PI_3K , del IRS1 e IRS-2 y evaluamos mediante la utilización de un anticuerpo específico la fosforilación en residuos de serina de ambos sustratos del receptor de insulina.

Tal y como se observa en la **figura 25**, la expresión del receptor de insulina, de la PI_3K , del IRS-1 y del IRS-2 en el músculo esquelético se encontraban notablemente incrementadas en las hembras nacidas de gestantes tratadas con englitazona con respecto al control. Sin embargo, el cociente pSerIRS-1/IRS-1, fue significativamente menor en las hembras nacidas de ratas gestantes tratadas con englitazona. Asimismo, al igual que habíamos observado para el IRS-1, aunque la expresión del IRS-2 fue significativamente superior en el músculo esquelético de las hembras nacidas de ratas gestantes tratadas con englitazona, el cociente pSerIRS-2/IRS-2 fue menor en las hembras tratadas con englitazona debido a la mayor expresión de IRS-2 en estos animales.

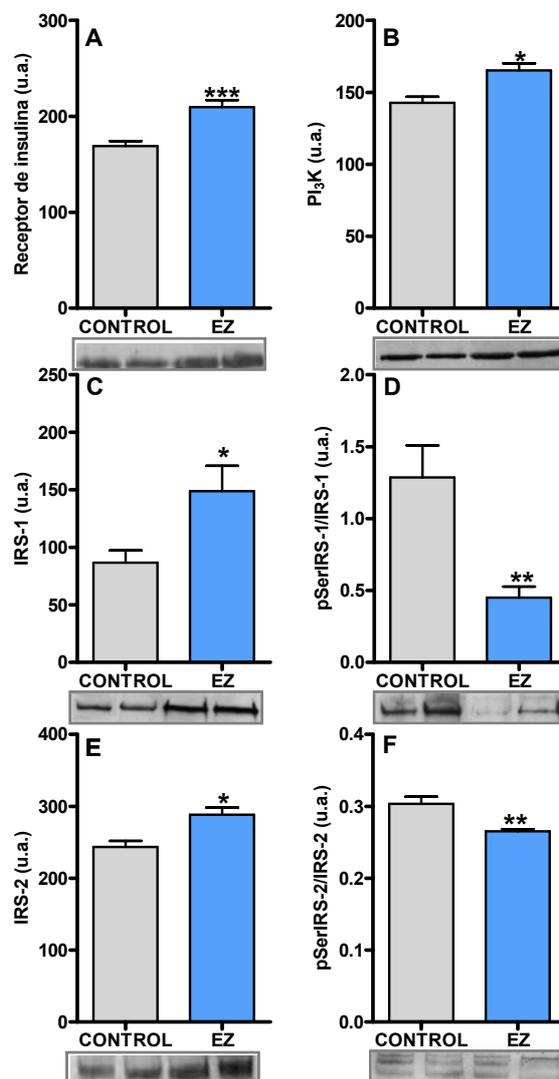


Figura 25: Expresión de receptor de insulina (A), expresión de la PI_3K (B) expresión del IRS-1 (C) y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-1 (D), expresión del IRS-2 (E) y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-2 (F) en el músculo esquelético de hembras nacidas de madres control y tratadas con englitazona. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.001$. Englitazona vs control**

Esta mayor expresión del receptor de insulina y de los IRSs en el músculo esquelético de las hembras nacidas de ratas gestantes tratadas ponen de manifiesto que existe una mayor disponibilidad de receptores a los que se

podría unir la insulina para ejercer su efecto y mayor disponibilidad de mediadores para transmitir la señal al interior celular.

Por otro lado, es bien conocido que la fosforilación en residuos de serina reduce la capacidad de los IRSs de interactuar con el dominio yuxtamembrana del receptor de insulina, atenúa la capacidad del receptor de insulina y de los IRSs de fosforilarse en tirosinas y se ha demostrado que promueve la degradación de los IRS. Todos estos efectos resultarían en una disminución de la propagación de la señal de la insulina al interior celular. Por estas razones, el menor cociente pSerIRS/IRS en el músculo de las hembras nacidas de ratas gestantes tratadas con englitazona, podría implicar una menor degradación de los IRSs, mayor interacción del receptor de insulina con los IRSs y una mayor fosforilación en tirosinas de dichos sustratos con el consecuente aumento en la propagación de la señal al interior celular.

Por último, para que tenga lugar la transducción de la señal al interior celular, se requiere del anclaje de la subunidad p85 de la PI₃K a través de su dominio SH2 a los IRS fosforilados en tirosinas. Este anclaje conlleva la aproximación de la PI₃K a los fosfoinositoles de la membrana celular donde genera fosfoinositoles mono-fosfato, bis-fosfato y tris-fosfato que actúan como segundos mensajeros y transmiten la señal al interior celular. Existen bastantes evidencias de que la PI₃K media gran parte de las acciones de la insulina como son la captación de glucosa a través del transportador de glucosa GLUT-4 y la conversión de glucosa en glucógeno en el músculo esquelético. De esta forma, la mayor expresión de PI₃K en el músculo esquelético de las hembras nacidas de gestantes tratadas con englitazona podría estar contribuyendo

también al aumento de la señalización de la insulina en estos animales.

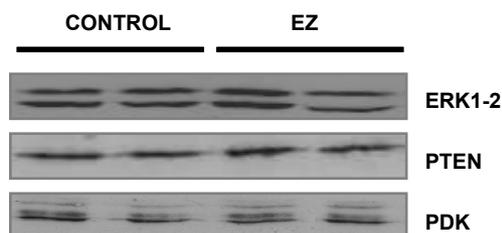


Figura 26: Expresión de la ERK1-2 PDK y PTEN en el músculo de las hembras nacidas de madres control y tratadas con englitazona.

Finalmente, analizamos la expresión de otras proteínas de la cascada de señalización de la insulina como son la ERK1-2, la PDK y la PTEN cuyos resultados se recogen en la **figura 26**. En este caso, ninguna de las tres proteínas estudiadas presentó una expresión diferente en el músculo esquelético de las hembras nacidas de madres tratadas con englitazona con respecto a las hembras controles.

b) Machos

Como se muestra en la **figura 27**, el análisis de la expresión del receptor de insulina en el músculo esquelético de los machos reveló una mayor cantidad de receptores en el músculo esquelético de los machos descendientes de madres tratadas.

Los niveles expresión del sustrato del receptor de insulina tipo 1 (**figura 27**), así como la fosforilación en serinas del IRS-1 fueron similares en el grupo de animales nacidos de gestantes tratadas con englitazona y en el grupo control.

Sin embargo, la expresión del IRS-2 (**figura 27**) fue significativamente superior en los machos nacidos de madres tratadas con englitazona, y el cociente pSerIRS-2/IRS-2 se

encontraba disminuido con respecto a sus controles.

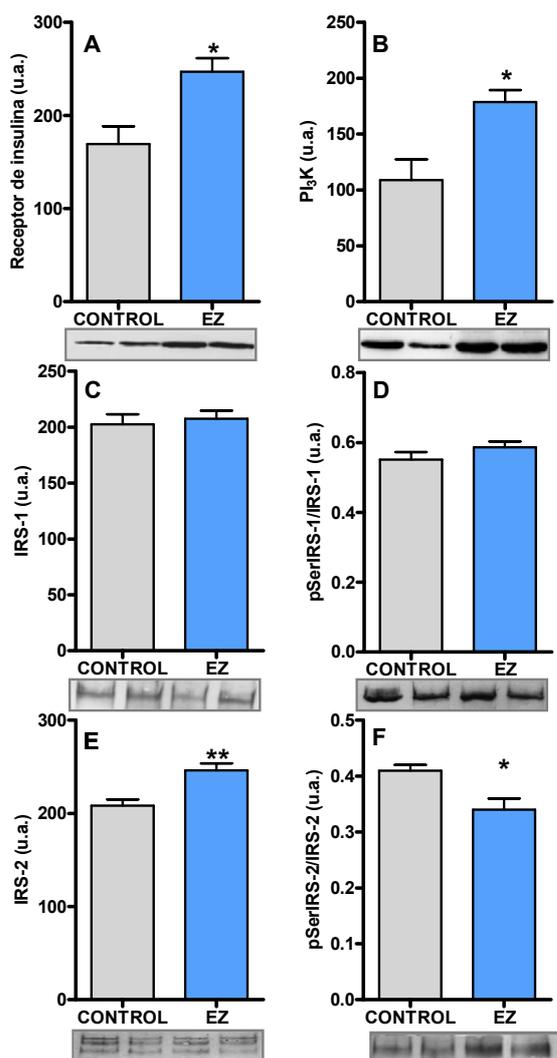


Figura 27: Expresión de receptor de insulina (A), expresión de la PI₃K (B) expresión del IRS-1 (C) y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-1 (D), expresión del IRS-2 (E) y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-2 (F) en el músculo esquelético de los machos nacidos de madres control y tratadas con englitazona.

*=p<0.05, **=p<0.001. Englitazona vs control

En la **figura 27**, se recogen también los resultados obtenidos en la determinación de la expresión de la PI₃K en el músculo esquelético de los descendientes machos. Al igual que se había observado en el caso de las hembras, los niveles de PI₃K fueron significativamente

superiores en el grupo de animales nacidos de madres tratadas.

Finalmente, determinamos la expresión de ERK1-2, la PTEN y la PDK cuyos resultados se recogen en la **figura 28**. Todas estas proteínas presentaron valores similares de expresión en el músculo de los machos de madres tratadas y en el de machos nacidos de madres controles.

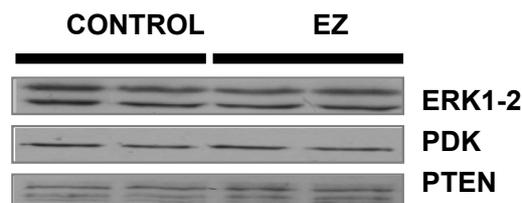


Figura 28: Expresión de la ERK1-2, PDK y PTEN en el músculo de los machos nacidos de madres control y tratadas con englitazona.

En conjunto, en el músculo esquelético de los machos nacidos de gestantes tratadas con englitazona, la expresión del receptor de insulina fue significativamente superior que en el grupo control. Por otro lado, aunque no se observaron diferencias en la expresión ni en la fosforilación en serinas del IRS-1, la mayor expresión y la menor fosforilación en serinas del IRS-2 ponen de manifiesto una mayor disponibilidad de este sustrato para ser fosforilado por el receptor de insulina. Finalmente, también observamos una mayor expresión de la PI₃K en los machos descendientes de madres tratadas. Estos resultados, en conjunto, permitirían sugerir que la mayor expresión de estas proteínas de la cascada de señalización de la insulina en el músculo esquelético podría estar contribuyendo también a la mayor sensibilidad a dicha hormona observada en estos animales.

2.2.2 Tejido adiposo lumbar

a) Hembras

Tal y como se observa en la **figura 29**, no se observaron diferencias en la expresión del receptor de insulina, del IRS-1, de la PI₃K ni de la ERK1-2 en el tejido adiposo de los animales nacidos de madres tratadas con respecto a su grupo control. En lo que respecta a la fosforilación en los residuos de serina del IRS-1 en el tejido adiposo de las hembras nacidas de ratas tratadas con englitazona tampoco fue diferente con respecto a la de sus correspondientes controles.

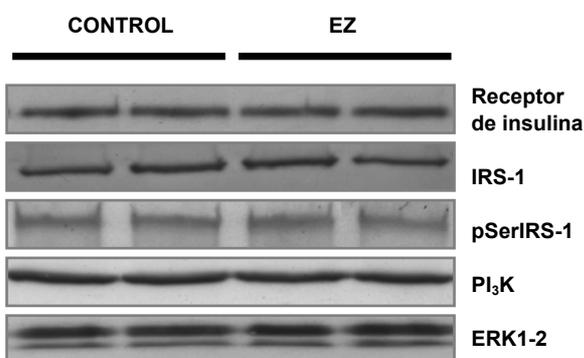


Figura 29: Receptor de insulina, IRS-1, pSer IRS-1, PI₃K y MAPK en el tejido adiposo de las hembras nacidas de ratas gestantes tratadas con vehículo (Control) o englitazona (EZ). Las fotografías muestran la expresión de las proteínas en el tejido adiposo de las ratas gestantes obtenidas por Western Blot.

b) Machos

En primer lugar, analizamos la expresión del receptor de insulina, y como se recoge en la **figura 30**, ésta fue significativamente superior en el tejido adiposo lumbar de los machos nacidos de madres tratadas.

El análisis de la expresión del IRS-1 en el tejido adiposo lumbar de los machos, no reveló diferencias debidas a la exposición al antidiabético de sus madres durante la gestación. Sin embargo, cuando determinamos la relación pSerIRS-1/IRS-1, ésta se encontraba disminuida en el tejido adiposo lumbar de los machos nacidos de madres tratadas

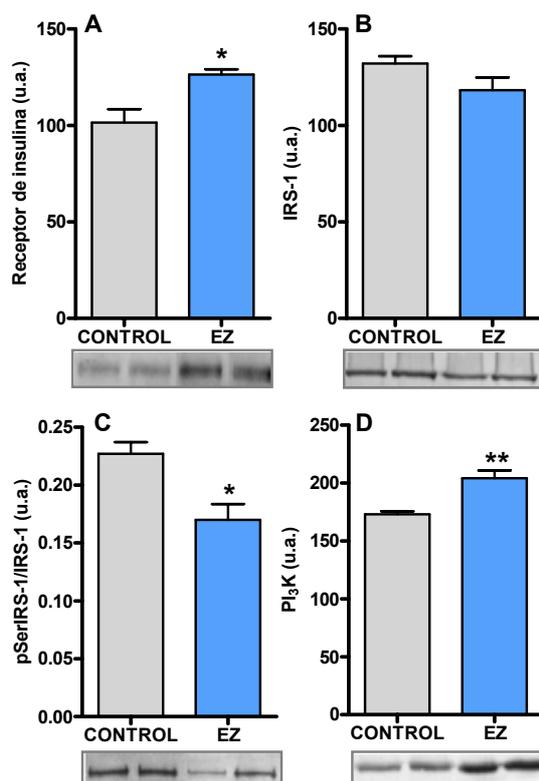


Figura 30: Expresión de receptor de insulina, expresión y fosforilación basal en residuos de serina del IRS-1 en el tejido adiposo lumbar de los machos nacidos de madres control y tratadas con englitazona.

*= $p < 0.05$. Englitazona vs control.

Asimismo, el análisis de la expresión de la subunidad reguladora de la PI₃K reveló que ésta era significativamente mayor en los animales nacidos de las gestantes tratadas con el antidiabético. El estudio molecular de la cascada de señalización de la insulina en el músculo esquelético y tejido adiposo blanco reveló una mayor expresión del receptor de insulina, PI₃K e IRSs y menor fosforilación en serinas de los IRSs. Dado que el tratamiento con englitazona a la madre revierte la resistencia a la insulina y que los neonatos fueron más pequeños en el momento del nacimiento, podríamos suponer que el tratamiento ha conducido a una ligera subnutrición. Asimismo, no se puede descartar que se haya producido una programación de los mecanismos de control de la ingesta que persista hasta la vida adulta, dado que los animales comen menos y el incremento de peso corporal es menor.

En este sentido, en estudios de otros autores que subnutrieron a los animales desde la segunda fase de la gestación y en los sucesivos días de vida postnatal, en las crías lactantes subnutridas se observó una mayor expresión del receptor de insulina, de la PI3K, así como de una mayor translocación de GLUT-4 tras la estimulación con insulina (495). Asimismo, estos mismos autores han observado un aumento del receptor de insulina y de la captación de glucosa mediada por insulina en las ratas subnutridas a los 70 días de vida postnatal (496).

Aunque desconocemos los mecanismos subyacentes, esta aumentada expresión de las proteínas de la cascada de señalización de la insulina podría contribuir a la mejora en la respuesta a la insulina que se observa en estos animales.

2.3. Efecto del tratamiento con englitazona sobre los la presión arterial y relajación vascular de la descendencia

2.3.1 Presión arterial

Como hemos ido describiendo a lo largo de la presente memoria, el tratamiento al final de la gestación con el antidiabético englitazona afecta de forma permanente a los descendientes en etapas posteriores del desarrollo. En este sentido, estos descendientes presentaron una menor ganancia de peso corporal, una menor concentración de lípidos plasmáticos y una mayor tolerancia a la glucosa que sus respectivos controles. Todo ello sugiere que dicho tratamiento durante la etapa fetal podría estar jugando un papel protector frente al desarrollo de diabetes, hiperlipemia y/o obesidad cuando son adultos. Para analizar si dicho tratamiento también estuviera mejorando la presión arterial en estos animales, se midió la presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y presión arterial media. Como se observa en la **figura 31**, el tratamiento de ratas gestantes con englitazona produce una disminución muy importante de la presión arterial sistólica, diastólica y media de sus descendientes de 60 semanas de edad, tanto en los machos como en las hembras. Los resultados presentados ponen de manifiesto que el tratamiento de las gestantes con englitazona podría tener un efecto protector frente al desarrollo de hipertensión arterial de sus crías en la vida adulta. Asimismo, estos resultados apoyan la hipótesis de que no solo los factores de riesgo específicos asociados a determinados tipos de vida, sino también los cambios en el ambiente intrauterino durante la etapa fetal podrían contribuir o prevenir frente al desarrollo de la hipertensión arterial.

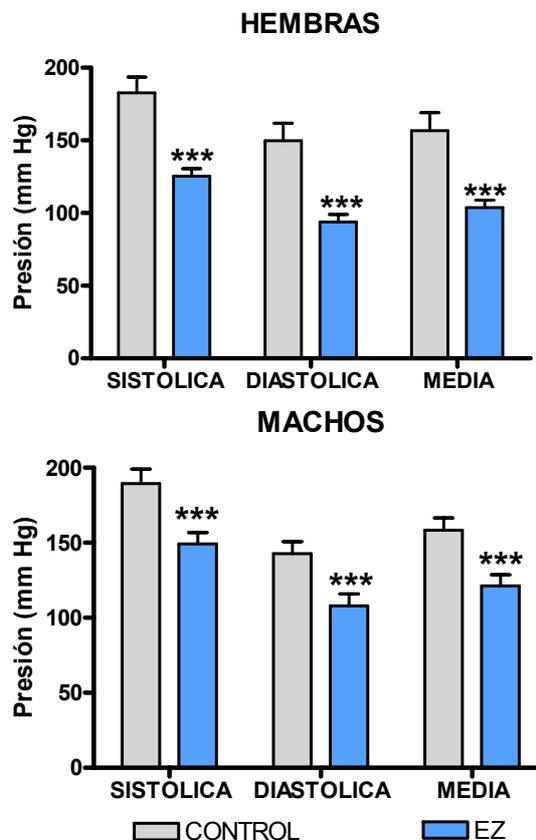


Figura 31: Efecto del tratamiento materno con englitazona sobre la presión arterial de la descendencia a la semana 60 de edad. ***= $p < 0.001$. Englitazona vs control.

2.3.2 Reactividad vascular en el lecho mesentérico perfundido.

Para analizar mejor el citado efecto estudiamos si la menor presión arterial observada en las crías por el tratamiento de las ratas gestantes con englitazona podría deberse a cambios en la reactividad vascular del lecho mesentérico.

Con este fin, en la semana 70 de vida postnatal se midió la respuesta vascular del lecho mesentérico de 10 animales nacidos de madres tratadas con englitazona (5 machos y

5 hembras) y otros 10 animales nacidos de madres controles.

a) Respuesta contráctil a vasoconstrictores no derivados del endotelio

Respuesta contráctil a KCl

Transcurrido el tiempo de equilibrado y para estudiar la respuesta contráctil del lecho mesentérico se indujo la contracción del mismo con KCl (75mM). Como se muestra en la **tabla 25**, el incremento en la tensión isométrica inducido por KCl tanto en las hembras como en los machos nacidos de madres tratadas con englitazona fue similar al observado en los nacidos de madres control,

lo cual indica que la capacidad contráctil del músculo liso vascular era similar en ambos grupos (**tabla 25**).

Respuesta contráctil a noradrenalina y angiotensina 2

Como se observa en la **tabla 25**, la respuesta del lecho mesentérico tanto a noradrenalina $10^{-5}M$ como a angiotensina 2 de los descendientes de madres tratadas fue similar a la de los nacidos de madres control. Estos resultados ponen de manifiesto que la respuesta a dicho agonista α adrenérgico y a la angiotensina 2 a los 18 meses de edad no se ve influida por el tratamiento de sus madres con el antidiabético durante la gestación.

Tabla 56: Respuesta contráctil en el lecho mesentérico profundido en la semana 70 de vida.

	HEMBRAS		MACHOS	
	Control	Englitazona	Control	Englitazona
KCl (75mM) mm Hg	42.0 ± 6.1	59.1 ± 10.1	42.4 ± 6.4	58.9 ± 10.5
NA($10^{-5}M$) (% KCl)	172.9 ± 52.1	129.2 ± 27.8	122.0 ± 22.1	108.3 ± 31.2
Angiotensina 2 ($3 \times 10^{-8}M$) (% KCl)	20.4 ± 11.2	13.5 ± 4.8	12.2 ± 3.5	8.1 ± 3.3
4 Aminopiridina ($2 \times 10^{-3}M$) (% KCl)	15.3 ± 9.0	13.0 ± 6.3	10.7 ± 3.7	6.6 ± 2.1
L NAME (% KCl)	0.7 ± 2.1	7.1 ± 3.61	7.6 ± 3.7	1.6 ± 0.7
L NAME + Noradrenalina ($10^{-5}M$) (% KCl)	309.0 ± 50.6	289.0 ± 80.5	166.3 ± 37.3	223.9 ± 47.0

La contracción y relajación mediada por vasoconstrictores y vasodilatadores se expresa como porcentaje de contracción/relajación respecto a la contracción inducida por KCl.

Inhibición de canales de potasio dependientes de voltaje

Con objeto de estudiar el papel del factor relajante derivado del adipocito (ADRF) sobre la relajación vascular, se incubó el lecho mesentérico con 4 aminopiridina, un inhibidor de los canales de potasio dependientes de

voltaje (Kv) bloqueando el efecto del ADRF secretado por la grasa perivascular. Como se muestra también en la **tabla 25**, las respuestas contráctiles tras la incubación con 4 aminopiridina no se vieron modificadas por el tratamiento en la etapa perinatal con englitazona siendo similares tanto en machos como en hembras de ambos grupos.

b) Respuesta vasodilatadora del lecho mesentérico

La relajación máxima inducida por la acetilcolina (ACh) en el lecho mesentérico de las hembras de 18 meses nacidas de madres tratadas con englitazona (**figura 32**) fue similar a la observada en las ratas nacidas de madres controles, lo cual indica que el tratamiento con el antidiabético no afecta la relajación dependiente de endotelio a la ACh. Sin embargo, como se observa en la figura 32, la respuesta vasodilatadora a nitroprusiato fue mayor en las hembras nacidas de gestantes tratadas, lo cual sugiere que la capacidad del

músculo liso de responder a un donador exógeno de NO es mayor en este grupo. Cuando analizamos la relajación máxima inducida por la Ach en el lecho mesentérico de los machos de 18 meses nacidos de madres tratadas con englitazona, ésta era significativamente mayor con respecto a la de las ratas nacidas de madres controles. Esta mayor respuesta se reflejó en un aumento en su efecto máximo y una disminución en la dosis necesaria para producir el 50% del efecto máximo indicando que en estos animales existe una mayor relajación dependiente de endotelio a la acetilcolina

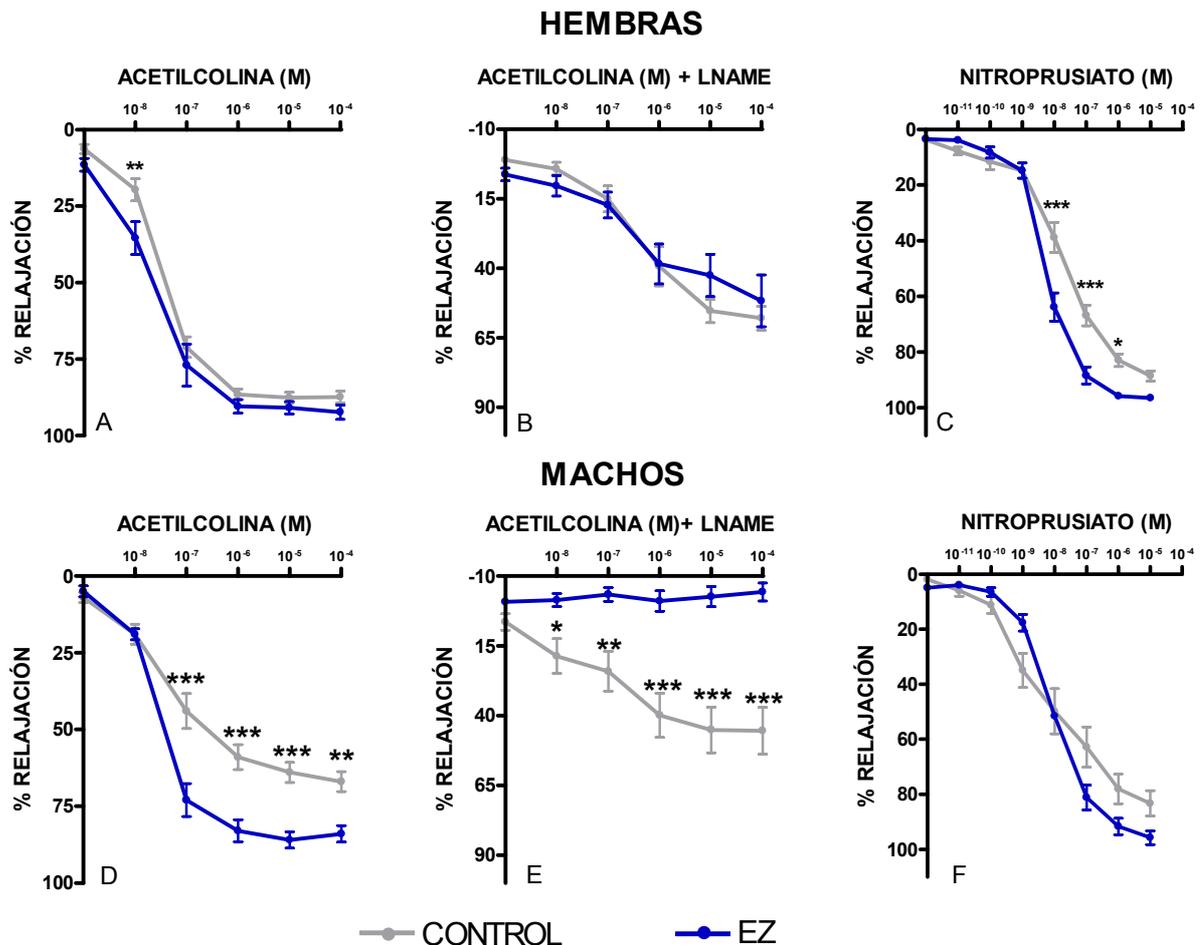


Figura 32: Curvas dosis-respuesta acumuladas de Acetilcolina (A), Acetilcolina en presencia de L-NAME (B) y Nitroprusiato (C) en el lecho mesentérico de las hembras y de Acetilcolina (D), Acetilcolina en presencia de L-NAME (E) y Nitroprusiato (F) en el lecho mesentérico de los machos en la semana 70 de vida. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$. Englitazona vs control.

Cuando analizamos la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio mediada por nitroprusiato sódico tal y como se recoge en las correspondientes curvas dosis-respuesta (**figura 32**), observamos que la capacidad del músculo liso de responder a un dador exógeno de NO fue similar en ambos grupos.

Efecto de la inhibición del NO sobre la respuesta vasoconstrictora a noradrenalina y posterior vasodilatación con acetilcolina

Quisimos también analizar el efecto de la producción basal de NO. Para ello, perfundimos el lecho mesentérico con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa, L-NAME. Como se recoge en la **tabla 25**, el tratamiento con L-NAME produjo un incremento en la presión de perfusión que no fue diferente entre las hembras nacidas de madres tratadas con englitazona y las hembras nacidas de madres controles. Asimismo, la presencia de L-NAME incrementó la contracción debida a noradrenalina $10^{-5}M$, siendo este incremento semejante en ambos grupos.

A continuación, quisimos estudiar la contribución del NO a la relajación vascular mediada por acetilcolina. Los resultados obtenidos que se recogen en la **figura 32** tampoco revelaron diferencias entre grupos y sugieren que la producción de NO en las arterias de resistencia es similar en los descendientes hembras de ambos grupos. Asimismo, estos resultados ponen de manifiesto que la contribución a la relajación dependiente de Ach de los factores derivados del endotelio fue un 50% dependiente de óxido nítrico y un 50% dependiente de factores relajantes derivados de endotelio en los dos casos.

En lo que respecta a los machos, la incubación con L-NAME produjo una respuesta contráctil del lecho mesentérico y un incremento en la contracción a noradrenalina $10^{-5}M$ cuando se encuentra inhibido el NO, semejante en ambos grupos; por lo que este efecto parece ser independiente del tratamiento de sus madres con englitazona durante la gestación.

Sin embargo, a pesar de que, la relajación dependiente de Acetilcolina se encontraba significativamente aumentada en los machos nacidos de madres tratadas, cuando bloqueamos la producción de NO basal mediante la perfusión del inhibidor de la óxido nítrico sintasa L-NAME, observamos que la capacidad de la acetilcolina de inducir la relajación en el lecho mesentérico había sido completamente bloqueada en estos animales mientras en los machos nacidos de madres control (**figura 32**) solo había sido bloqueada parcialmente. De esta forma, la contribución a la relajación dependiente de Ach de los factores derivados del endotelio fue un 50% dependiente de óxido nítrico (NO) en los machos nacidos de madres controles, mientras que en los machos nacidos de madres tratadas fue dependiente de NO al 100%.

Estos resultados sugieren que el tratamiento de sus las ratas gestantes con englitazona tiene consecuencias también sobre la presión arterial de sus descendientes cuando son adultos. En el caso de los machos mejora la relajación endotelial por un aumento en la producción de NO en las arterias de resistencia en estos animales. En el caso de las hembras la menor presión arterial se debe a un aumento en la relajación inducida por NO en el lecho mesentérico.

El tratamiento con TZDs ha demostrado producir un ligero descenso, si bien

significativo de los niveles de presión arterial (497). Sin embargo, dado que el tratamiento fue administrado únicamente a las madres durante la última etapa de la gestación, y los efectos se observan en los descendientes adultos es poco plausible que pudiera ser un efecto directo del fármaco.

No obstante, es bien conocido que alteraciones en el ambiente fetal pueden inducir cambios estructurales o funcionales

que afecten al control de la presión arterial en los descendientes cuando son adultos (498). Por tanto no podemos descartar que esta mayor respuesta vascular del lecho mesentérico y la menor presión arterial en los descendientes de madres tratadas con el antidiabético, podrían tener su origen en una programación de los mecanismos de control de la presión arterial en su etapa fetal.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

A continuación se muestra un resumen de los resultados más relevantes de la presente tesis:

CAPÍTULO I

A pesar de que el tratamiento con englitazona no modificó la glucemia, la insulinemia fue significativamente menor en las ratas gestantes a las que se administró el antidiabético. Los resultados obtenidos en el OGTT, así como los índices de sensibilidad a la insulina (HOMA-IR QUICKI y FGIR) revelaron que la englitazona revierte el estado de resistencia a la insulina presente en la gestante a término.

Por otro lado, el tratamiento con englitazona produjo una marcada reducción de la hiperlipemia, y un menor acúmulo de lípidos en el tejido adiposo lumbar y en el hígado de las ratas gestantes. Todo lo cual podría estar relacionado con una mejora en la sensibilidad a la insulina en la madre.

Esta mejora en la respuesta a la insulina fue paralela a un aumento en la expresión y secreción de adiponectina y a una disminución en la expresión y secreción de resistina, así como de una disminución de la fosforilación en residuos de serina del IRS-1, y no de cambios en la expresión de otras proteínas de la cascada de señalización de la insulina.

CAPÍTULO II

El tratamiento con englitazona produce un retraso en el crecimiento intrauterino de las crías, que pudo ser explicado por una disminución en los niveles de IGF1 plasmáticos. Asimismo, las crías nacidas de madres tratadas con englitazona presentaron hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina que perduró al menos hasta el final de la lactancia

El tratamiento con englitazona afectó a la acumulación lipídica tisular en los neonatos ya que por una parte disminuyó el peso como el contenido de triglicéridos hepáticos, mientras que aumentó el contenido de triglicéridos en el tejido adiposo marrón, el cual presentaba un aspecto macroscópico más propio del tejido adiposo blanco.

Sin embargo, tras la lactancia y en la vida adulta, el tratamiento con englitazona de ratas gestantes podría estar protegiendo a sus descendientes frente al desarrollo de hiperlipemia y obesidad, ya que peso corporal, el contenido de los depósitos grasos y los parámetros lipídicos en plasma fueron menores en los descendientes de madres tratadas con englitazona.

Por su parte, los niveles de glucosa e insulina y los índices de sensibilidad a la insulina (HOMA-IR QUICKI y FGIR) mostraron que las crías nacidas de madres tratadas presentaban mayor sensibilidad a la insulina, lo cual fue corroborado con los resultados obtenidos en los tests de sobrecarga oral de glucosa. Asimismo, el estudio molecular de la cascada de señalización de la insulina en el músculo

esquelético y tejido adiposo blanco reveló que la mayor sensibilidad a la insulina podría deberse a un aumento de la expresión del receptor de insulina, PI₃K e IRSs; proteínas implicadas en la transmisión de la señal al interior celular y a la menor fosforilación en serinas de los IRSs. Todos estos resultados permiten sugerir que el tratamiento con englitazona de las ratas gestantes podría proteger a sus descendientes frente al

desarrollo de resistencia a la insulina y/o diabetes en la edad adulta.

Finalmente, la mayor respuesta vascular del lecho mesentérico y, como consecuencia, la menor presión arterial en los descendientes de madres tratadas con el antidiabético ponen de manifiesto que el tratamiento de las gestantes con englitazona podría tener un efecto protector frente al desarrollo de hipertensión arterial de sus crías en la vida adulta.

CONCLUSIONES

El tratamiento de ratas gestantes en el último tercio de gestación con englitazona disminuye la hiperlipemia y revierte la resistencia a la insulina en la gestante a término a través de una disminución en la fosforilación en la ser307 del IRS-1 y un aumento paralelo de los niveles de adiponectina.

El tratamiento con englitazona de las ratas durante el último tercio de la gestación produce un menor crecimiento postnatal y produce resistencia a la insulina en las crías que perdura hasta el momento del destete.

En la edad adulta los descendientes de madres tratadas con englitazona presentan menor peso corporal, menor concentración de lípidos plasmáticos, mayor tolerancia a la glucosa, disminución en la adiposidad, y una menor presión arterial. Todos estos resultados permiten sugerir que el tratamiento con englitazona de las ratas gestantes podría proteger a su descendencia frente al desarrollo de diabetes, obesidad e hipertensión en la etapa adulta.

BIBLIOGRAFIA

1. **Seino S, Seino M, Bell GI** 1990 Human insulin-receptor gene. *Diabetes* 39:129-133
2. **White MF, Kahn CR** 1994 The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269:1-4
3. **Denton RM, Brownsey RW, Belsham GJ** 1981 A partial view of the mechanism of insulin action. *Diabetologia* 21:347-362
4. **White MF, Kahn CR** 1994 The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269:1-4
5. **White MF, Kahn CR** 1994 The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269:1-4
6. **Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y** 1997 A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:29911-29918
7. **Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y** 1997 A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:29911-29918
8. **Yamamoto-Honda R, Kadowaki T, Momomura K, Tobe K, Tamori Y, Shibasaki Y, Mori Y, Kaburagi Y, Koshio O, Akanuma Y, .** 1993 Normal insulin receptor substrate-1 phosphorylation in autophosphorylation-defective truncated insulin receptor. Evidence that phosphorylation of substrates might be sufficient for certain biological effects evoked by insulin. *J Biol Chem* 268:16859-16865
9. **Boura-Halfon S, Zick Y** 2009 Serine kinases of insulin receptor substrate proteins. *Vitam Horm* 80:313-349
10. **Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y** 1997 A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:29911-29918
11. **Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y** 1997 A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:29911-29918
12. **Kellerer M, Lammers R, Häring H-U** 1999 Insulin signal transduction: possible mechanism for insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:97-106
13. **White MF, Maron R, Kahn CR** 1985 Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* 318:183-186
14. **Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U** 1997 Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4171-4175
15. **Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR** 2001 Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 21:26-38
16. **Haslam RJ, Koide HB, Hemmings BA** 1993 Pleckstrin domain homology. *Nature* 363:309-310
17. **Wolf G, Trub T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF, Miyazaki M, Lee J, Shoelson SE** 1995 PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *J Biol Chem* 270:27407-27410
18. **White MF** 1998 The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res* 53:119-38.:119-138
19. **Cheatham B, Kahn CR** 1995 Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16:117-142
20. **Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE** 1997 The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272:11439-11443
21. **Lavan BE, Fatin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE** 1997 A novel 160-Kda phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272:21403-21407
22. **Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF** 1991 Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352:73-77
23. **Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF** 1995 Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature* 377:173-177
24. **Inukai K, Funaki M, Ogihara T, Katagiri H, Kanda A, Anai M, Fukushima Y, Hosaka T, Suzuki M, Shin BC, Takata K, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T** 1997 p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem* 272:7873-7882
25. **Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, Kahn CR** 2000 Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent

- signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 20:8035-8046
26. **Rameh LE, Cantley LC** 1999 The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274:8347-8350
 27. **Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K** 1998 Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333 (Pt 3):471-490
 28. **Vanhaesebroeck B, Alessi DR** 2000 The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3:561-76.:561-576
 29. **Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT** 1997 Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277:567-570
 30. **Cohen P** 2006 The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:867-873
 31. **Hajdуч E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS** 1998 Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47:1006-1013
 32. **Watson RT, Pessin JE** 2001 Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res* 56:175-193
 33. **Kanai F, Ito K, Todaka M, Hayashi H, Kamohara S, Ishii K, Okada T, Hazeki O, Ui M, Ebina Y** 1993 Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 195:762-768
 34. **Jiang T, Sweeney G, Rudolf MT, Klip A, Traynor-Kaplan A, Tsien RY** 1998 Membrane-permeant esters of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273:11017-11024
 35. **Tanti JF, Grillo S, Gremeaux T, Coffier PJ, Van Obberghen E, Marchand-Brustel Y** 1997 Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 138:2005-2010
 36. **Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA** 1996 Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 271:31372-31378
 37. **Foran PG, Fletcher LM, Oatey PB, Mohammed N, Dolly JO, Tavaré JM** 1999 Protein kinase B stimulates the translocation of GLUT4 but not GLUT1 or transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes by a pathway involving SNAP-23, synaptobrevin-2, and/or cellubrevin. *J Biol Chem* 274:28087-28095
 38. **Roy S, McPherson RA, Apolloni A, Yan J, Lane A, Clyde-Smith J, Hancock JF** 1998 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 18:3947-3955
 39. **Marshall CJ** 1995 Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185
 40. **Holman GD, Kasuga M** 1997 From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* 40:991-1003
 41. **Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K** 1998 Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333:471-490
 42. **Czech MP, Corvera S** 1999 Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 274:1865-1868
 43. **Lawrence JC, Jr., Roach PJ** 1997 New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes* 46:541-547
 44. **Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA** 1995 Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789
 45. **Cohen P, Alessi DR, Cross DA** 1997 PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett* 410:3-10
 46. **Kraus-Friedmann N** 1984 Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Physiol Rev* 64:170-259
 47. **Hers HG, Hue L** 1983 Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu Rev Biochem* 52:617-53.:617-653
 48. **Nakamura T, Yoshimoto K, Aoyama K, Ichihara A** 1982 Hormonal regulations of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lipogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biochem* 91:681-693
 49. **Beynen AC, Vaartjes WJ, Geelen MJ** 1980 Acute effects of insulin on fatty acid metabolism in isolated rat hepatocytes. *Horm Metab Res* 12:425-430
 50. **Geelen MJ, Gibson DM** 1975 Lipogenesis in maintenance cultures of rat hepatocytes. *FEBS Lett* 58:334-339
 51. **Witters LA, Trasko CS** 1979 Regulation of hepatic free fatty acid metabolism by glucagon and insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 237:E23 E29
 52. **Vaartjes WJ, den Breejen JN, Geelen MJ, van den Bergh SG** 1980 Persistent changes in the initial rate of pyruvate transport by isolated rat liver mitochondria after preincubation with adenine nucleotides and calcium ions. *Biochim Biophys Acta* 592:28-37

53. **Beynen AC, Geelen MJ** 1982 Short-term regulation of hepatic triacylglycerol metabolism by insulin and glucagon. *Vet Res Commun* 5:223-236
54. **Beynen AC, Geelen MJ** 1981 Control of glycogen metabolism by insulin in isolated hepatocytes. *Horm Metab Res* 13:376-378
55. **Beynen AC, Vaartjes WJ, Geelen MJ** 1979 Opposite effects of insulin and glucagon in acute hormonal control of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 28:828-835
56. **Olansky L, Pohl SL** 1984 beta-Adrenergic desensitization by chronic insulin exposure in 3T3-L1 cultured adipocytes. *Metabolism* 33:76-81
57. **Degerman E, Smith CJ, Tornqvist H, Vasta V, Belfrage P, Manganiello VC** 1990 Evidence that insulin and isoprenaline activate the cGMP-inhibited low-Km cAMP phosphodiesterase in rat fat cells by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:533-537
58. **El Hadri K, Charon C, Pairault J, Hauguel-de Mouzon S, Quignard-Boulangé A, Feve B** 1997 Down-regulation of beta₃-adrenergic receptor expression in rat adipose tissue during the fasted/fed transition: evidence for a role of insulin. *J Biochem* 323:359-364
59. **Feve B, El Hadri K, Quignard-Boulangé A, Pairault J** 1994 Transcriptional down-regulation by insulin of the beta 3-adrenergic receptor expression in 3T3-F442A adipocytes: a mechanism for repressing the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5677-5681
60. **Kahn CR, Flier JS, Bar RS, Archer JA, Gorden P, Martin MM, Roth J** 1976 The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. *Insulin-receptor disorders in man. N Engl J Med* 294:739-745
61. **Saltiel AR** 2000 Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J Clin Invest* 106:163-164
62. **Zimmet P, Alberti KG, Shaw J** 2001 Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787
63. **Reaven GM** 1993 Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med* 44:121-31.:121-131
64. **Tavare JM, Siddle K** 1993 Mutational analysis of insulin receptor function: consensus and controversy. *Biochim Biophys Acta* 1178:21-39
65. **Kahn CR** 1995 Diabetes. Causes of insulin resistance. *Nature* 373:384-385
66. **Krook A, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR** 2004 Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake. *Med Sci Sports Exerc* 36:1212-1217
67. **Rangwala SM, Lazar MA** 2004 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 25:331-336
68. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556
69. **Siiteri PK** 1987 Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr* 45:277-282
70. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
71. **Ahima RS, Flier JS** 2000 Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11:327-332
72. **Ailhaud G** 2006 Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol* 329:570-577
73. **Ahima RS, Flier JS** 2000 Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11:327-332
74. **Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA** 2001 The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-E847
75. **Cannon B, Nedergaard J** 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359
76. **Rangwala SM, Lazar MA** 2004 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 25:331-336
77. **Boden G** 1998 Free fatty acids (FFA), a link between obesity and insulin resistance. *Front Biosci* 3:d169-d175
78. **Roden M** 2004 How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci* 19:92-96
79. **Hawkins M, Tonelli J, Kishore P, Stein D, Ragucci E, Gitig A, Reddy K** 2003 Contribution of elevated free fatty acid levels to the lack of glucose effectiveness in type 2 diabetes. *Diabetes* 52:2748-2758
80. **Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI** 1999 Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103:253-259
81. **Vaag A, Skott P, Damsbo P, Gall MA, Richter EA, Beck-Nielsen H** 1991 Effect of the antilipolytic nicotinic acid analogue acipimox on whole-body and skeletal muscle glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 88:1282-1290

82. **Roden M** 2004 How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci* 19:92-96
83. **Randle PJ** 1998 Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14:263-283
84. **Randle PJ** 1998 Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14:263-283
85. **Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI** 1996 Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97:2859-2865
86. **Rothman DL, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn CR, Shulman RG, Shulman GI** 1995 Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:983-987
87. **Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI** 1996 Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 97:2859-2865
88. **Shulman GI** 2000 Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176
89. **Stadtmauer L, Rosen OM** 1986 Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and protein kinase activity of the insulin receptor. *J Biol Chem* 261:3402-3407
90. **Kruszynska YT, Worrall DS, Ofrecio J, Frias JP, Macaraeg G, Olefsky JM** 2002 Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* 87:226-234
91. **Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI** 1999 Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103:253-259
92. **Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA** 2001 The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-E847
93. **Cannon B, Nedergaard J** 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359
94. **Denton RM, Brownsey RW, Belsham GJ** 1981 A partial view of the mechanism of insulin action. *Diabetologia* 21:347-362
95. **Rangwala SM, Lazar MA** 2004 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 25:331-336
96. **Borst SE** 2004 The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine* 23:177-182
97. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM** 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91
98. **Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM** 1995 Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-2415
99. **Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ** 1992 Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 130:43-52
100. **Borst SE** 2004 The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine* 23:177-182
101. **Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM** 1994 Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 94:1543-1549
102. **Stephens JM, Pekala PH** 1992 Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulation is coordinate and independent of protein synthesis. *J Biol Chem* 267:13580-13584
103. **Ryden M, Dicker A, van H, V, Hauner H, Brunnberg M, Perbeck L, Lonnqvist F, Arner P** 2002 Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* 277:1085-1091
104. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556
105. **Wajchenberg BL** 2000 Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21:697-738
106. **Friedman JM, Halaas JL** 1998 Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770
107. **Bjorbaek C, Kahn BB** 2004 Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59:305-331
108. **Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G** 2002 Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J* 16:1163-1176
109. **Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL** 1999 Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401:73-76
110. **Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL** 1999 Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401:73-76

111. **Perez C, Fernandez-Galaz C, Fernandez-Agullo T, Arribas C, Andres A, Ros M, Carrascosa JM** 2004 Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53:347-353
112. **Perez C, Fernandez-Galaz C, Fernandez-Agullo T, Arribas C, Andres A, Ros M, Carrascosa JM** 2004 Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53:347-353
113. **Eddy AA** 2002 Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F209-F220
114. **Eddy AA** 2002 Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F209-F220
115. **Alessi MC, Juhan-Vague I** 2004 Contribution of PAI-1 in cardiovascular pathology. *Arch Mal Coeur Vaiss* 97:673-678
116. **Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B** 2000 Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3338-3342
117. **Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B** 2000 Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3338-3342
118. **Otarod JK, Goldberg IJ** 2004 Lipoprotein lipase and its role in regulation of plasma lipoproteins and cardiac risk. *Curr Atheroscler Rep* 6:335-342
119. **Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA** 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312
120. **Banerjee RR, Lazar MA** 2001 Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem* 276:25970-25973
121. **Chen J, Wang L, Boeg YS, Xia B, Wang J** 2002 Differential dimerization and association among resistin family proteins with implications for functional specificity. *J Endocrinol* 175:499-504
122. **Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L** 2004 Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 304:1154-1158
123. **Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE, Rossetti L** 2004 Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 114:232-239
124. **Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE, Rossetti L** 2004 Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 114:232-239
125. **Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L** 2003 Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111:225-230
126. **Le Lay S, Boucher J, Rey A, Castan-Laurell I, Krief S, Ferre P, Valet P, Dugail I** 2001 Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 289:564-567
127. **Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Jr., Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS** 2001 Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 276:25651-25653
128. **Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF, Ho LT** 2001 Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 289:1328-1333
129. **Nagaev I, Smith U** 2001 Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 285:561-564
130. **Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS** 2001 A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 276:11252-11256
131. **Janke J, Engeli S, Gorzelnik K, Luft FC, Sharma AM** 2002 Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 10:1-5
132. **Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF** 1995 A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746-26749
133. **Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K** 1996 cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221:286-289
134. **Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M** 1996 Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 120:803-812
135. **Hu E, Liang P, Spiegelman BM** 1996 AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-10703
136. **Henry RR, Mudaliar SR, Howland WC, III, Chu N, Kim D, An B, Reinhardt RR** 2003 Inhaled insulin using the AERx Insulin Diabetes Management System in healthy and asthmatic subjects. *Diabetes Care* 26:764-769
137. **Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM** 1996 Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 271:13018-13022

138. **Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR** 2003 Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26:2442-2450
139. **Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE** 2003 Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278:9073-9085
140. **Berg AH, Combs TP, Scherer PE** 2002 ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:84-89
141. **Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GJ** 2002 Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem* 277:19521-19529
142. **Matsubara M, Maruoka S, Katayose S** 2002 Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 147:173-180
143. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyagawa K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y** 1999 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83
144. **Hu E, Liang P, Spiegelman BM** 1996 AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-10703
145. **Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B** 2003 Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E527-E533
146. **Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, Olefsky JM** 2002 The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 51:2968-2974
147. **Bogan JS, Lodish HF** 1999 Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *J Cell Biol* 146:609-620
148. **Smith U, Axelsen M, Carvalho E, Eliasson B, Jansson PA, Wesslau C** 1999 Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 892:119-26.:119-126
149. **Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y** 2001 Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50:1126-1133
150. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T** 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946
151. **Tajiri Y, Hiramatsu S, Karashima T, Mimura K, Umeda F**, Adiponectin as a reliable marker for insulin resistance in type 2 diabetic patients. p A305 (Abstract)
152. **Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE** 2001 The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7:947-953
153. **Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L** 2001 Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108:1875-1881
154. **Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A** 2002 Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2395
155. **Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF** 2001 Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010
156. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T** 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946
157. **Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF** 2001 Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010
158. **Guo L, Tabrizchi R** 2006 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacol Ther* 111:145-173
159. **Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA** 2002 Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1407-1433
160. **Meriden T** 2004 Progress with thiazolidinediones in the management of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 26:177-190
161. **Sheehan JP** 2004 Fasting hyperglycemia: etiology, diagnosis, and treatment. *Diabetes Technol Ther* 6:525-533

162. **Sheehan JP** 2004 Fasting hyperglycemia: etiology, diagnosis, and treatment. *Diabetes Technol Ther* 6:525-533
163. **Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Matsuda M, Cusi K, Mahankali A, Mahankali S, Mandarino LJ, DeFronzo RA** 2001 Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in Type II diabetic patients. *Diabetologia* 44:2210-2219
164. **Bajaj M, Suraamornkul S, Piper P, Hardies LJ, Glass L, Cersosimo E, Pratipanawatr T, Miyazaki Y, DeFronzo RA** 2004 Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89:200-206
165. **Suter SL, Nolan JJ, Wallace P, Gumbiner B, Olefsky JM** 1992 Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 15:193-203
166. **Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J** 1994 Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med* 331:1188-1193
167. **Meriden T** 2004 Progress with thiazolidinediones in the management of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 26:177-190
168. **Ahima RS, Flier JS** 2000 Leptin. *Annu Rev Physiol* 62:413-37.:413-437
169. **Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF** 1995 A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746-26749
170. **Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA** 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-302
171. **Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA** 2001 The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-E847
172. **Kastner P, Mark M, Chambon P** 1995 Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83:859-869
173. **Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, .** 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839
174. **Reddy JK, Rao MS** 1986 Peroxisome proliferators and cancer: mechanisms and implications. *Trends in Pharmacological Sciences* 7:438-443
175. **Issemann I, Green S** 1990 Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650
176. **Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W** 1992 Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68:879-887
177. **Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM** 1992 Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6:329-344
178. **Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W** 1996 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-366
179. **Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ** 1998 Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 273:5678-5684
180. **Jones PS, Savory R, Barratt P, Bell AR, Gray TJ, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Bell DR** 1995 Chromosomal localisation, inducibility, tissue-specific expression and strain differences in three murine peroxisome-proliferator-activated-receptor genes. *Eur J Biochem* 233:219-226
181. **Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM** 1994 Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7355-7359
182. **Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB** 1998 Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem* 70:1366-1375
183. **Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W** 1996 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-366
184. **Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J** 1997 The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789
185. **Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J** 1999 PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 99:3125-3131
186. **Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK** 1998 Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and

- regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7614-7619
187. **Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A** 1998 Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393:790-793
 188. **Michalik L, Wahli W** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol* 10:564-570
 189. **Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, Kelly DP** 1998 A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest* 102:1083-1091
 190. **Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimakopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J** 1996 Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 271:1764-1769
 191. **Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103:1489-1498
 192. **Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP** 1999 A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7473-7478
 193. **Braissant O, Wahli W** 1998 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 139:2748-2754
 194. **Quigg M, Clayburn H, Straume M, Menaker M, Bertram EH, III** 1999 Hypothalamic neuronal loss and altered circadian rhythm of temperature in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 40:1688-1696
 195. **Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK** 1997 Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91:197-208
 196. **Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK** 1999 Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* 13:1561-1574
 197. **Walczak R, Tontonoz P** 2002 PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res* 43:177-186
 198. **Berger J, Moller DE** 2002 The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53:409-35.:409-435
 199. **Ohshima T, Koga H, Shimotohno K** 2004 Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 279:29551-29557
 200. **Issemann I, Green S** 1990 Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650
 201. **Desvergne B, Wahli W** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20:649-688
 202. **Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV** 1998 Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395:137-143
 203. **Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Klier SA, Willson TM, Stimmel JB** 2002 Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* 415:813-817
 204. **Zhu P, Lu L, Xu Y, Schwartz GG** 2000 Troglitazone improves recovery of left ventricular function after regional ischemia in pigs. *Circulation* 101:1165-1171
 205. **Auwerx J** 1999 PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42:1033-1049
 206. **Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J** 1997 The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789
 207. **Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J** 1998 PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438:55-60
 208. **Zhou J, Wilson KM, Medh JD** 2002 Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator-activated receptor-gamma splice variants in monkey macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 293:274-283
 209. **Desvergne B, Wahli W** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20:649-688
 210. **Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV** 1998 Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395:137-143
 211. **Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, Bertilsson G, Jendeborg L, Berkenstam A** 1998 Crystal

- structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR γ . *J Biol Chem* 273:31108-31112
212. **Willson TM, Wahli W** 1997 Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 1:235-241
213. **Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W** 1992 Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68:879-887
214. **Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV** 1999 Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3:397-403
215. **Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM** 1992 Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358:771-774
216. **Reginato MJ, Bailey ST, Krakow SL, Minami C, Ishii S, Tanaka H, Lazar MA** 1998 A potent antidiabetic thiazolidinedione with unique peroxisome proliferator-activated receptor gamma-activating properties. *J Biol Chem* 273:32679-32684
217. **Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM** 1995 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803-812
218. **Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA** 1995 Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270:23975-23983
219. **Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W** 1992 Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68:879-887
220. **Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA** 1997 Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272:3406-3410
221. **Tolman KG, Chandramouli J** 2003 Hepatotoxicity of the thiazolidinediones. *Clin Liver Dis* 7:369-79, vi
222. **Fujita T, Sugiyama Y, Taketomi S, Sohda T, Kawamatsu Y, Iwatsuka H, Suzuoki Z** 1983 Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes* 32:804-810
223. **Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG** 1992 Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 41:393-398
224. **Harris PK, Kletzien RF** 1994 Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. *Mol Pharmacol* 45:439-445
225. **Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM** 1994 mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8:1224-1234
226. **O'Moore-Sullivan TM, Prins JB** 2002 Thiazolidinediones and type 2 diabetes: new drugs for an old disease. *Med J Aust* 176:381-386
227. **Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM** 1996 The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem* 39:665-668
228. **Imoto H, Imamiya E, Momose Y, Sugiyama Y, Kimura H, Sohda T** 2002 Studies on non-thiazolidinedione antidiabetic agents. 1. Discovery of novel oxyminoacetic acid derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 50:1349-1357
229. **Henke BR, Blanchard SG, Brackeen MF, Brown KK, Cobb JE, Collins JL, Harrington WW, Jr., Hashim MA, Hull-Ryde EA, Kaldor I, Kliewer SA, Lake DH, Leesnitzer LM, Lehmann JM, Lenhard JM, Orband-Miller LA, Miller JF, Mook RA, Jr., Noble SA, Oliver W, Jr., Parks DJ, Plunket KD, Szewczyk JR, Willson TM** 1998 N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *J Med Chem* 41:5020-5036
230. **Imoto H, Sugiyama Y, Kimura H, Momose Y** 2003 Studies on non-thiazolidinedione antidiabetic agents. 2. Novel oxyminoalkanoic acid derivatives as potent glucose and lipid lowering agents. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 51:138-151
231. **Imoto H, Sugiyama Y, Kimura H, Momose Y** 2003 Studies on non-thiazolidinedione antidiabetic agents. 2. Novel oxyminoalkanoic acid derivatives as potent glucose and lipid lowering agents. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 51:138-151
232. **Miyata KS, McCaw SE, Marcus SL, Rachubinski RA, Capone JP** 1994 The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene* 148:327-330
233. **Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W** 2006 From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 45:120-159
234. **Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B** 1997 Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional

- analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272:20108-20117
235. **Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG** 1999 Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9:140-147
236. **Zhu Y, Qi C, Calandra C, Rao MS, Reddy JK** 1996 Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr* 6:185-195
237. **Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK** 1997 Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 272:25500-25506
238. **Corton JC, Anderson SP, Stauber A** 2000 Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:491-518
239. **Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM** 2000 Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14:1293-1307
240. **Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM** 1995 Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5:571-576
241. **Ntambi JM, Young-Cheul K** 2000 Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S
242. **Lowell BB** 1999 PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 99:239-242
243. **Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM** 1994 Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156
244. **Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM** 1995 Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9856-9860
245. **Green H, Kehinde O** 1975 An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5:19-27
246. **Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM** 1978 Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 253:7570-7578
247. **Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM** 1999 PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617
248. **Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN, Spiegelman BM** 2000 A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 275:1873-1877
249. **Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM** 1999 PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-595
250. **Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM** 1999 PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617
251. **Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, .** 1999 PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4:597-609
252. **Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S** 1999 Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880-883
253. **Rangwala SM, Lazar MA** 2004 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 25:331-336
254. **Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM** 1994 Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 22:5628-5634
255. **Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J** 1996 PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15:5336-5348
256. **Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J** 1997 Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 272:28210-28217
257. **Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N** 1997 Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57:17-21
258. **Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, Tanen M, Berg AH, O'Rahilly S, Savage DB, Chatterjee K, Weiss S, Larson PJ, Gottesdiener KM, Gertz BJ,**

- Charron MJ, Scherer PE, Moller DE** 2002 Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 143:998-1007
259. **Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J** 1995 Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270:19269-19276
260. **Rangwala SM, Lazar MA** 2004 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 25:331-336
261. **Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM** 1995 PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15:351-357
262. **Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA** 2002 A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 8:1122-1128
263. **Rangwala SM, Lazar MA** 2004 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 25:331-336
264. **Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Jr., Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS** 2001 Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 276:25651-25653
265. **Smith U, Gogg S, Johansson A, Olausson T, Rotter V, Svalstedt B** 2001 Thiazolidinediones (PPARgamma agonists) but not PPARalpha agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. *FASEB J* 15:215-220
266. **Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T** 1998 Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101:1354-1361
267. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS** 1998 Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809
268. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T** 2001 The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 276:41245-41254
269. **Olefsky JM** 1976 The effects of spontaneous obesity on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. *J Clin Invest* 57:842-851
270. **Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T** 1998 Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101:1354-1361
271. **Tchkonia T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Tchoukalova Y, Karagiannides I, Forse RA, DePonte M, Stevenson M, Guo W, Han J, Waloga G, Lash TL, Jensen MD, Kirkland JL** 2002 Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R1286-R1296
272. **Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD** 2004 Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 113:1582-1588
273. **Bonen A, Campbell SE, Benton CR, Chabowski A, Coort SL, Han XX, Koonen DP, Glatz JF, Luiken JJ** 2004 Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proc Nutr Soc* 63:245-249
274. **Heron-Milhavet L, Haluzik M, Yakar S, Gavrilova O, Pack S, Jou WC, Ibrahimi A, Kim H, Hunt D, Yau D, Asghar Z, Joseph J, Wheeler MB, Abumrad NA, LeRoith D** 2004 Muscle-specific overexpression of CD36 reverses the insulin resistance and diabetes of MKR mice. *Endocrinology* 145:4667-4676
275. **Herrera E, Ayanz A** 1972 Calculation of lipolysis and esterification from glycerol metabolism in rat adipose tissue. *J Lipid Res* 13:802-809
276. **Kalhan SC, Mahajan S, Burkett E, Reshef L, Hanson RW** 2001 Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans. *J Biol Chem* 276:12928-12931
277. **Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM, Hanson RW** 2003 Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 278:30413-30416
278. **Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM** 1995 PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15:351-357
279. **Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA** 2002 A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 8:1122-1128
280. **Olswang Y, Cohen H, Papo O, Cassuto H, Croniger CM, Hakimi P, Tilghman SM, Hanson RW, Reshef L** 2002 A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:625-630
281. **Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM** 1995 PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the

- phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15:351-357
282. **Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA** 2002 A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 8:1122-1128
283. **Tordjman J, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Forest C, Antoine B** 2003 Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. *J Biol Chem* 278:18785-18790
284. **Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V, Shulman GI** 1998 Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 338:867-872
285. **Kintscher U, Law RE** 2005 PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E287-E291
286. **Hotamisligil GS** 1999 The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 245:621-625
287. **Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y** 2001 PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50:2094-2099
288. **Randle PJ** 1998 Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14:263-283
289. **Rieusset J, Chambrier C, Bouzakri K, Dusserre E, Auwerx J, Riou JP, Laville M, Vidal H** 2001 The expression of the p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is induced by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human adipocytes. *Diabetologia* 44:544-554
290. **Meyer MM, Levin K, Grimmshmann T, Perwitz N, Eirich A, Beck-Nielsen H, Klein HH** 2002 Troglitazone treatment increases protein kinase B phosphorylation in skeletal muscle of normoglycemic subjects at risk for the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2691-2697
291. **Shintani M, Nishimura H, Yonemitsu S, Ogawa Y, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Nakao K** 2001 Troglitazone not only increases GLUT4 but also induces its translocation in rat adipocytes. *Diabetes* 50:2296-2300
292. **Momoi A, Murao K, Imachi H, Sayo Y, Nakamura H, Hosokawa H, Sato M, Fujita J, Okada H, Ishida T, Takahara J** 1999 Thiazolidinedione inhibits production of RANTES in a cytokine-treated human lung epithelial cell line. *FEBS Lett* 452:301-304
293. **Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, Spiegelman BM** 1994 Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134:264-270
294. **Miles PD, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Rafaat K, Olefsky JM** 1997 TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 46:1678-1683
295. **Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G** 2002 Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J* 16:1163-1176
296. **Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, Sarraf P, Spiegelman BM, Lowell BB** 1997 Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. *J Biol Chem* 272:5283-5290
297. **Kallen CB, Lazar MA** 1996 Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5793-5796
298. **De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J** 1996 Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* 98:1004-1009
299. **Bajaj M, Suraamornkul S, Hardies LJ, Pratipanawatr T, DeFronzo RA** 2004 Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:783-789
300. **Haugen F, Jorgensen A, Drevon CA, Trayhurn P** 2001 Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507:105-108
301. **Sheehan JP** 2004 Fasting hyperglycemia: etiology, diagnosis, and treatment. *Diabetes Technol Ther* 6:525-533
302. **McTernan PG, Fisher FM, Valsamakis G, Chetty R, Harte A, McTernan CL, Clark PM, Smith SA, Barnett AH, Kumar S** 2003 Resistin and type 2 diabetes: regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 88:6098-6106
303. **Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Jr., Willson TM, Klierer SA, Hotamisligil GS** 2001 Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 276:25651-25653
304. **Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y** 2001 PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations

- of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50:2094-2099
305. **Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, Taniyama M, Tomita M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Oguma Y, Takei I, Saruta T** 2002 Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 51:314-317
306. **Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, Taniyama M, Tomita M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Oguma Y, Takei I, Saruta T** 2002 Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 51:314-317
307. **Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Wang JP, Chen CL, Tai TY, Chuang LM** 2002 Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 25:376-380
308. **Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, Tanen M, Berg AH, O'Rahilly S, Savage DB, Chatterjee K, Weiss S, Larson PJ, Gottesdiener KM, Gertz BJ, Charron MJ, Scherer PE, Moller DE** 2002 Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 143:998-1007
309. **Das K, Lin Y, Widen E, Zhang Y, Scherer PE** 2001 Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Acrp30. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1120-1129
310. **Barth N, Langmann T, Scholmerich J, Schmitz G, Schaffler A** 2002 Identification of regulatory elements in the human adipose most abundant gene transcript-1 (apM-1) promoter: role of SP1/SP3 and TNF-alpha as regulatory pathways. *Diabetologia* 45:1425-1433
311. **Herrera E, Munoz C, Lopez-Luna P, Ramos P** 1994 Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res* 27:2499-2519
312. **Herrera E, Palacin M, Martin A, Lasuncion MA** 1985 Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes* 34 Suppl 2:42-46
313. **Lasuncion MA, Lorenzo J, Palacin M, Herrera E** 1987 Maternal factors modulating nutrient transfer to fetus. *Biol Neonate* 51:86-93
314. **Herrera E, Munoz C, Lopez-Luna P, Ramos P** 1994 Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res* 27:2499-2519
315. **Hytten FE, Leitch I** 1971 The physiology of human pregnancy. 2nd ed. Oxford: Blackwell; 359-364
316. **Lopez-Luna P, Muñoz T, Herrera E** 1986 Body fat in pregnant rats at mid- and late- gestation. *Life Sci* 39:1389-1393
317. **Bonet B, Herrera E** 1988 Different response to maternal hypothyroidism during the first and second half of gestation in the rat. *Endocrinology* 122:450-455
318. **Eriksson UJ** 1984 Diabetes in pregnancy: retarded fetal growth, congenital malformations and feto-maternal concentrations of zinc, copper and manganese in the rat. *J Nutr* 114:477-484
319. **Herrera E, Lopez-Soldado I, Limones M, Amusquivar E, Ramos MP** 2005 Experimental models for studying perinatal lipid metabolism. Long-term effects of perinatal undernutrition. *Adv Exp Med Biol* 569:95-108
320. **Knopp R.H., Saudek C.D., Arky R.A., O'Sullivan JB** 1973 Two phases of adipose tissue metabolism in pregnancy: maternal adaptations for fetal growth. *Endocrinology* 92:984-989
321. **Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO** 1970 Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim Biophys Acta* 210:473-482
322. **Knopp RH, Boroush MA, O'Sullivan JB** 1975 Lipid metabolism in pregnancy. II. Postheparin lipolytic activity and hypertriglyceridemia in the pregnant rat. *Metabolism* 24:481-493
323. **Ramos MP, Crespo-Solans MD, del Campo S, Cacho J, Herrera E** 2003 Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E318-E328
324. **Herrera E** 2000 Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr* 54 Suppl 1:S47-S51
325. **Herrera E, Lasunción MA, Martín A, Zorzano A** 1992 Carbohydrate-lipid interactions in pregnancy. In: Herrera E, Knopp RH, eds. *Perinatal biochemistry*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1-18
326. **Lasuncion MA, Herrera E** 1981 "In Vitro" utilization of labelled esterified fatty acids and glyceride glycerol from triglyceride-rich lipoproteins in rat adipose tissue. *Horm Metab Res* 13:335-339
327. **Lasuncion MA, Herrera E** 1983 Changes with starvation in the rat of the lipoprotein lipase activity and hydrolysis of triacylglycerols from triacylglycerol-rich lipoproteins in adipose tissue preparations. *Biochem J* 210:639-643
328. **Muñoz C, Lopez-Luna P, Herrera E** 1995 Glucose and insulin tolerance tests in the rat on different days of gestation. *Biol Neonate* 68:282-291
329. **Sorenson RL, Brelje TC** 1997 Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell

- growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29:301-307
330. **Herrera E, Knopp RH, Freinkel N** 1969 Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat. *J Clin Invest* 48:2260-2272
331. **Herrera E, Muñoz Moreno C, Lopez-Luna P, Ramos P** 1994 Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Brazilian J Med Biol Res* 27:2499-2519
332. **Herrera E, Munoz C, Lopez-Luna P, Ramos P** 1994 Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res* 27:2499-2519
333. **Jovanovic L, Knopp RH, Brown Z, Conley MR, Park E, Mills JL, Metzger BE, Aarons JH, Holmes LB, Simpson JL** 2001 Declining insulin requirement in the late first trimester of diabetic pregnancy. *Diabetes Care* 24:1130-1136
334. **Schmitz O, Klebe J, Moller J, Arnfred J, Hermansen K, Orskov H, Beck-Nielsen H** 1985 In vivo insulin action in type 1 (insulin-dependent) diabetic pregnant women as assessed by the insulin clamp technique. *J Clin Endocrinol Metab* 61:877-881
335. **Ramos MP, Crespo-Solans MD, del Campo S, Cacho J, Herrera E** 2003 Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E318-E328
336. **Guesnet PM, Massoud MJ, Demarne Y** 1991 Regulation of adipose tissue metabolism during pregnancy and lactation in the ewe: the role of insulin. *J Anim Sci* 69:2057-2065
337. **Knopp RH, Herrera E, Freinkel N** 1970 Carbohydrate metabolism in pregnancy. VIII. Metabolism of adipose tissue isolated from fed and fasted rats during late gestation. *J Clin Invest* 49:1438-1446
338. **Muñoz C, Lopez-Luna P, Herrera E** 1995 Glucose and insulin tolerance tests in the rat on different days of gestation 155. *Biol Neonate* 68:282-291
339. **Knopp RH, Ruder HJ, Herrera E, Freinkel N** 1970 Carbohydrate metabolism in pregnancy. VII. Insulin tolerance during late pregnancy in the fed and fasted rat 40. *Acta Endocrinol (Copenh)* 65:352-360
340. **Knopp RH, Herrera E, Freinkel N** 1970 Carbohydrate metabolism in pregnancy. VIII. Metabolism of adipose tissue isolated from fed and fasted rats during late gestation 3. *J Clin Invest* 49:1438-1446
341. **Chaves JM, Herrera E** 1980 In vitro response of glycerol metabolism to insulin and adrenaline in adipose tissue from fed and fasted rats during pregnancy. 59. *Biol Neonate* 38:139-145
342. **Freinkel N.** Banting Lecture 1980. Of pregnancy and progeny. 45. p 1023 (Abstract)
343. **Freinkel N.** 1965 Effects of the conceptus on maternal metabolism during pregnancy. On the nature and Treatment of diabetes 679-691
344. **Martin A, Zorzano A, Caruncho I, Herrera E** 1986 Glucose tolerance tests and "in vivo" response to intravenous insulin in the unanaesthetized late pregnant rat and their consequences to the fetus. *Diabete Metab* 12:302-307
345. **Montes A, Humphrey J, Knopp RH, Childs MT** 1978 Lipid metabolism in pregnancy. VI. Lipoprotein composition and hepatic lipids in the fed pregnant rat. *Endocrinology* 103:1031-1038
346. **BLEICHER SJ, O'SULLIVAN JB, FREINKEL N** 1964 CARBOHYDRATE METABOLISM IN PREGNANCY. V. THE INTERRELATIONS OF GLUCOSE, INSULIN AND FREE FATTY ACIDS IN LATE PREGNANCY AND POST PARTUM. *N Engl J Med* 271:866-872
347. **Herrera E, Knopp RH, Freinkel N** 1969 Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat 39. *J Clin Invest* 48:2260-2272
348. **Herrera E., Lasuncion M.A., Martin A., Zorzano A.** 1992 Carbohydrate-lipid interactions in pregnancy 25. In: Herrera E., Knopp RH, eds. *Perinatal Biochemistry*. Boca Raton (Florida): CRC Press; 1-18
349. **Lin EC** 1977 Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Annu Rev Biochem* 46:765-795
350. **Valcarce C, Cuezva JM, Medina JM** 1985 Increased gluconeogenesis in the rat at term gestation. *Life Sci* 37:553-560
351. **Herrera E, Knopp RH, Freinkel N** 1969 Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat 39. *J Clin Invest* 48:2260-2272
352. **Zorzano A, Lasuncion MA, Herrera E** 1986 Role of the availability of substrates on hepatic and renal gluconeogenesis in the fasted late pregnant rat. *Metabolism* 35:297-303
353. **Metzger BE, Hare JW, FREINKEL N** 1971 Carbohydrate metabolism in pregnancy. IX. Plasma levels of gluconeogenic fuels during fasting in the rat. *J Clin Endocrinol Metab* 33:869-872
354. **Zorzano A, Lasuncion MA, Herrera E** 1986 Role of the availability of substrates on hepatic and renal gluconeogenesis in the fasted late pregnant rat. *Metabolism* 35:297-303
355. **Remesy C, Demigne C** 1986 Adaptation of hepatic gluconeogenesis and ketogenesis to

- altered supply of substrates during late pregnancy in the rat. *J Dev Physiol* 8:195-205
356. **Metzger BE, Hare JW, FREINKEL N** 1971 Carbohydrate metabolism in pregnancy. IX. Plasma levels of gluconeogenic fuels during fasting in the rat. *J Clin Endocrinol Metab* 33:869-872
357. **Zorzano A, Lasuncion MA, Herrera E** 1986 Role of the availability of substrates on hepatic and renal gluconeogenesis in the fasted late pregnant rat. *Metabolism* 35:297-303
358. **Zorzano A, Lasuncion MA, Herrera E** 1986 Role of the availability of substrates on hepatic and renal gluconeogenesis in the fasted late pregnant rat. *Metabolism* 35:297-303
359. **Zorzano A, Herrera E** 1986 Comparative utilization of glycerol and alanine as liver gluconeogenic substrates in the fed late pregnant rat. *Int J Biochem* 18:583-587
360. **Chaves JM, Herrera E** 1980 In vivo glycerol metabolism in the pregnant rat. *Biol Neonate* 37:172-179
361. **Leturque A, Ferre P, Burnol AF, Kande J, Maulard P, Girard J** 1986 Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* 35:172-177
362. **Leturque A., Guerre-Millo M., Lavau M., Girard J.** 1984 Effect of insulin on glucose metabolism in adipocytes from virgin and late-pregnant rats. *Biochem J* 224:685-688
363. **Leturque A, Ferre P, Burnol AF, Kande J, Maulard P, Girard J** 1986 Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* 35:172-177
364. **DiGiacomo JE, Hay WW, Jr.** 1990 Placental-fetal glucose exchange and placental glucose consumption in pregnant sheep. *Am J Physiol* 258:E360-E367
365. **Palacin M, Lasunción MA, Herrera E** 1987 Lactate production and absence of gluconeogenesis from placental transferred substrates in fetuses from fed and 48-H starved rats. *Pediatr Res* 22:6-10
366. **Herrera E, Palacin M, Martin A, Lasuncion MA** 1985 Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes* 34 Suppl 2:42-46
367. **Herrera E, Lasuncion MA, Palacin M, Zorzano A, Bonet B** 1991 Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* 40 Suppl 2:83-88
368. **Herrera E, Munoz C, Lopez-Luna P, Ramos P** 1994 Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res* 27:2499-2519
369. **De HR, Thomas K, Bietlot Y, Vanderheyden I, Ferin J** 1975 Plasma levels of unconjugated estrone, estradiol and estriol and of HCS throughout pregnancy in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 40:93-101
370. **Johansson ED** 1969 Plasma levels of progesterone in pregnancy measured by a rapid competitive protein binding technique. *Acta Endocrinol (Copenh)* 61:607-617
371. **Spellacy WN, Buhi WC, Birk SA, McCreary SA** 1974 Distribution of human placental lactogen in the last half of normal and complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 120:214-223
372. **FREINKEL N, GOODNER CJ** 1960 Carbohydrate metabolism in pregnancy. I. The metabolism of insulin by human placental tissue. *J Clin Invest* 39:116-131
373. **Young JB, Landsberg L** 1979 Sympathoadrenal activity in fasting pregnant rats. Dissociation of adrenal medullary and sympathetic nervous system responses. *J Clin Invest* 64:109-116
374. **Herrera EM, Knopp RH, FREINKEL N** 1969 Urinary excretion of epinephrine and norepinephrine during fasting in late pregnancy in the rat. *Endocrinology* 84:447-450
375. **Herrera E, Munoz C, Lopez-Luna P, Ramos P** 1994 Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res* 27:2499-2519
376. **Herrera E, Lasuncion MA, Gomez-Coronado D, Aranda P, Lopez-Luna P, Maier I** 1988 Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 158:1575-1583
377. **Montes A, Humphrey J, Knopp RH, Childs MT** 1978 Lipid metabolism in pregnancy. VI. Lipoprotein composition and hepatic lipids in the fed pregnant rat. *Endocrinology* 103:1031-1038
378. **Wasfi I, Weinstein I, Heimberg M** 1980 Increased formation of triglyceride from oleate in perfused livers from pregnant rats. *Endocrinology* 107:584-590
379. **Chaves JM, Herrera E** 1980 In vitro response of glycerol metabolism to insulin and adrenaline in adipose tissue from fed and fasted rats during pregnancy. *Biol Neonate* 38:139-145
380. **Herrera E., Lasuncion M.A., Martin A., Zorzano A.** 1992 Carbohydrate-lipid interactions in pregnancy. In: Herrera E., Knopp RH, eds. *Perinatal Biochemistry*. Boca Raton (Florida): CRC Press; 1-18
381. **Ramos P, Herrera E** 1996 Comparative responsiveness to prolonged hyperinsulinemia between adipose-tissue and mammary-gland lipoprotein lipase activities in pregnant rats. *Early Pregnancy* 2:29-35
382. **Wasfi I, Weinstein I, Heimberg M** 1980 Increased formation of triglyceride from oleate in

- perfused livers from pregnant rats. *Endocrinology* 107:584-590
383. **Herrera E, Lasunción MA, Gómez-Coronado D, Aranda P, Lopez-Luna P, Maier I** 1988 Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 158:1575-1583
384. **Herrera E, Ramos P, Lopez-Luna P, Lasunción MA** 1994 Metabolic interactions during pregnancy in preparation for lactation. In: Serrano M, Sastre A, Perez MA, Estrala A, de Sebastián C, eds. *Dairy Products in Human Health and Nutrition*. Rotterdam: A. A. Balkema; 189-197
385. **Ramos P, Herrera E** 1996 Comparative responsiveness to prolonged hyperinsulinemia between adipose-tissue and mammary-gland lipoprotein lipase activities in pregnant rats. *Early Pregnancy* 2:29-35
386. **Martin A, Zorzano A, Caruncho I, Herrera E** 1986 Glucose tolerance tests and "in vivo" response to intravenous insulin in the unanaesthetized late pregnant rat and their consequences to the fetus. *Diabete Metab* 12:302-307
387. **O'SULLIVAN JB, MAHAN CM** 1964 CRITERIA FOR THE ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST IN PREGNANCY. *Diabetes* 13:278-285
388. **Herrera E, Munoz C, Lopez-Luna P, Ramos P** 1994 Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res* 27:2499-2519
389. **Ramos P, Herrera E** 1995 Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. *Am J Physiol* 269:858-863
390. **Ramos P, Herrera E** 1995 Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. *Am J Physiol* 269:858-863
391. **Montelongo A, Lasuncion MA, Pallardo LF, Herrera E** 1992 Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes* 41:1651-1659
392. **Turtle JR, Kipnis DM** 1967 The lipolytic action of human placental lactogen on isolated fat cells. *Biochim Biophys Acta* 144:583-593
393. **Beck P, Daughaday WH** 1967 Human placental lactogen: studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man. *J Clin Invest* 46:103-110
394. **Rushakoff RJ, Kalkhoff RK** 1981 Effects of pregnancy and sex steroid administration on skeletal muscle metabolism in the rat. *Diabetes* 30:545-550
395. **Gonzalez C, Alonso A, Alvarez N, Diaz F, Martinez M, Fernandez S, Patterson AM** 2000 Role of 17beta-estradiol and/or progesterone on insulin sensitivity in the rat: implications during pregnancy. *J Endocrinol* 166:283-291
396. **Gonzalez C, Alonso A, Grueso NA, Esteban MM, Fernandez S, Patterson AM** 2002 Effect of treatment with different doses of 17-beta-estradiol on the insulin receptor. *Life Sci* 70:1621-1630
397. **Rushakoff RJ, Kalkhoff RK** 1981 Effects of pregnancy and sex steroid administration on skeletal muscle metabolism in the rat. *Diabetes* 30:545-550
398. **Batista MR, Smith MS, Snead WL, Connolly CC, Lacy DB, Moore MC** 2005 Chronic estradiol and progesterone treatment in conscious dogs: effects on insulin sensitivity and response to hypoglycemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R1064-R1073
399. **Kirwan JP, Huston-Presley L, Kalhan SC, Catalano PM** 2001 Clinically useful estimates of insulin sensitivity during pregnancy: validation studies in women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 24:1602-1607
400. **Chaves JM, Herrera E** 1980 In vitro response of glycerol metabolism to insulin and adrenaline in adipose tissue from fed and fasted rats during pregnancy. *Biol Neonate* 38:139-145
401. **Boden G** 2001 Pathogenesis of type 2 diabetes. Insulin resistance. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30:801-15, v
402. **Roden M, Stingl H, Chandramouli V, Schumann WC, Hofer A, Landau BR, Nowotny P, Waldhausl W, Shulman GI** 2000 Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* 49:701-707
403. **Gaudet D, Arsenault S, Perusse L, Vohl MC, St Pierre J, Bergeron J, Despres JP, Dewar K, Daly MJ, Hudson T, Rioux JD** 2000 Glycerol as a correlate of impaired glucose tolerance: dissection of a complex system by use of a simple genetic trait. *Am J Hum Genet* 66:1558-1568
404. **Boden G** 1997 Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3-10
405. **Hubel CA, McLaughlin MK, Evans RW, Hauth BA, Sims CJ, Roberts JM** 1996 Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated, and decrease within 48 hours post partum. *Am J Obstet Gynecol* 174:975-982
406. **Phelps RL, Metzger BE, FREINKEL N** 1981 Carbohydrate metabolism in pregnancy. XVII. Diurnal profiles of plasma glucose, insulin, free fatty acids, triglycerides, cholesterol, and individual amino acids in late normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 140:730-736
407. **Sivan E, Boden G** 2003 Free fatty acids, insulin resistance, and pregnancy. *Curr Diab Rep* 3:319-322

408. **Hauguel S, Gilbert M, Girard J** 1987 Pregnancy-induced insulin resistance in liver and skeletal muscles of the conscious rabbit. *Am J Physiol* 252:E165-E169
409. **Gilbert M, Basile S, Baudelin A, Pere MC** 1993 Lowering plasma free fatty acid levels improves insulin action in conscious pregnant rabbits. *Am J Physiol* 264:E576-E582
410. **Sivan E, Boden G** 2003 Free fatty acids, insulin resistance, and pregnancy. *Curr Diab Rep* 3:319-322
411. **Gilbert M, Basile S, Baudelin A, Pere MC** 1993 Lowering plasma free fatty acid levels improves insulin action in conscious pregnant rabbits. *Am J Physiol* 264:E576-E582
412. **Sivan E, Boden G** 2003 Free fatty acids, insulin resistance, and pregnancy. *Curr Diab Rep* 3:319-322
413. **Sivan E, Boden G** 2003 Free fatty acids, insulin resistance, and pregnancy. *Curr Diab Rep* 3:319-322
414. **Flint DJ, Sinnott-Smith PA, Clegg RA, Vernon RG** 1979 Role of insulin receptors in the changing metabolism of adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *Biochem J* 182:421-427
415. **Flint DJ** 1985 Role of insulin and the insulin receptor in nutrient partitioning between the mammary gland and adipose tissue. *Biochem Soc Trans* 13:828-829
416. **Haruta T, Uno T, Kawahara J, Takano A, Egawa K, Sharma PM, Olefsky JM, Kobayashi M** 2000 A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol* 14:783-794
417. **Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA** 2003 Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem* 278:8199-8211
418. **Gavin JR 3rd, Roth J, Neville DM Jr, de Meyts P, Buell DN** 1974 Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. *Proc Natl Acad Sci* 71:84-88
419. **Crettaz M, Kahn CR** 1984 Insulin receptor regulation and desensitization in rat hepatoma cells. Concomitant changes in receptor number and in binding affinity. *Diabetes* 33:477-485
420. **Sutter-Dub MT, Sfaxi A, Latrille F, Sodoyez-Goffaux F, Sodoyez JC** 1984 Insulin binding and action in adipocytes of pregnant rats: evidence that insulin resistance is caused by post-receptor binding defects. *J Endocrinol* 102:209-214
421. **Gonzalez CG, Alonso A, Balbin M, Diaz F, Fernandez S, Patterson AM** 2002 Effects of pregnancy on insulin receptor in liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats. *Gynecol Endocrinol* 16:193-205
422. **Saad MJ, Maeda L, Brenelli SL, Carvalho CR, Paiva RS, Velloso LA** 1997 Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia* 40:179-186
423. **Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Qiao L, Friedman JE** 2002 Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E522-E533
424. **Sevillano J, de CJ, Bocos C, Herrera E, Ramos MP** 2007 Role of insulin receptor substrate-1 serine 307 phosphorylation and adiponectin in adipose tissue insulin resistance in late pregnancy. *Endocrinology* 148:5933-5942
425. **Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF** 2000 The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275:9047-9054
426. **Clarke SD** 2001 Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improved the metabolic syndrome. *J Nutr* 131:1132
427. **Vamecq J, Latruffe N** 1999 Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 354:141-148
428. **Ribon V, Johnson JH, Camp HS, Saltiel AR** 1998 Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14751-14756
429. **Lopez-Luna P, Maier I, Herrera E** 1991 Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol Neonate* 60:29-38
430. **Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM** 2002 TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 51:2207-2213
431. **Amico JA, Thomas A, Crowley RS, Burmeister LA** 1998 Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue. *Life Sci* 63:1387-1395
432. **Herrera E, Lasuncion MA, Huerta L, Martin-Hidalgo A** 2000 Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biol Neonate* 78:315-320
433. **Caja S, Martinez I, Abelenda M, Puerta M** 2005 Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats. *J Endocrinol* 185:551-559
434. **Fuglsang J, Skjaerbaek C, Frystyk J, Flyvbjerg A, Ovesen P** 2006 A longitudinal study of serum adiponectin during normal pregnancy. *BJOG* 113:110-113
435. **Sevillano J, de CJ, Bocos C, Herrera E, Ramos MP** 2007 Role of insulin receptor

- substrate-1 serine 307 phosphorylation and adiponectin in adipose tissue insulin resistance in late pregnancy. *Endocrinology* 148:5933-5942
436. **Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston-Presley L, Bernard S, Kalhan S, Hauguel-De MS** 2006 Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 49:1677-1685
437. **Trinder P** 1969 Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J Clin Pathol* 22:246
438. **Trinder P** 1969 Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J Clin Pathol* 22:246
439. **Barham D, Trinder P** 1972 An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97:142-145
440. **Matsuda M, DeFronzo RA** 1999 Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22:1462-1470
441. **McGregor DD** 1965 The effect of the sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels on the rat. *J Physiol* 177:21-30
442. **Folch J., Lees M., Solane Stanley G.H.** 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509
443. **Friedenauer S, Berlet HH** 1989 Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal Biochem* 178:263-268
444. **Laemmli UK** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
445. **Lebovitz HE, Dole JF, Patwardhan R, Rappaport EB, Freed MI** 2001 Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:280-288
446. **Fonseca V** 2003 Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am J Med* 115 Suppl 8A:42S-48S
447. **Watkins SM, Reifsnnyder PR, Pan HJ, German JB, Leiter EH** 2002 Lipid metabolome-wide effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone. *J Lipid Res* 43:1809-1817
448. **Carey DG, Cowin GJ, Galloway GJ, Jones NP, Richards JC, Biswas N, Doddrell DM** 2002 Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients [corrected]. *Obes Res* 10:1008-1015
449. **Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, Petersen KF** 2002 The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 51:797-802
450. **Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Makimattila S, Yki-Jarvinen H** 2004 Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2169-2176
451. **Bajaj M, Suraamornkul S, Pratipanawatr T, Hardies LJ, Pratipanawatr W, Glass L, Cersosimo E, Miyazaki Y, DeFronzo RA** 2003 Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:1364-1370
452. **Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Makimattila S, Yki-Jarvinen H** 2004 Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2169-2176
453. **Herrera E** 2000 Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *European Journal of Clinical Nutrition Suppl.* 1:S47-S51
454. **Kuhl C, Hornnes PJ** 1984 Plasma insulin, proinsulin, and pancreatic glucagon in gestational diabetes. In: Melchionda N, ed. *Recent advances in obesity and diabetes research*. New York: Raven Press; 129-138
455. **Fonseca V** 2003 Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am J Med* 115 Suppl 8A:42S-48S
456. **Kuhl C, Hornnes PJ** 1984 Plasma insulin, proinsulin, and pancreatic glucagon in gestational diabetes 165. In: Melchionda N, ed. *Recent advances in obesity and diabetes research*. New York: Raven Press; 129-138
457. **Myllynen P, Koivisto VA, Nikkila EA** 1987 Glucose intolerance and insulin resistance accompany immobilization. *Acta Med Scand* 222:75-81
458. **Cacho J, Sevillano J, de CJ, Herrera E, Ramos MP** 2008 Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1269-E1276
459. **Stumvoll M, Haring HU** 2002 Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Ann Med* 34:217-224
460. **Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM** 1998 Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93:229-240
461. **Kishida K, Shimomura I, Nishizawa H, Maeda N, Kuriyama H, Kondo H, Matsuda M, Nagaretani H, Ouchi N, Hotta K, Kihara S, Kadowaki T, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2001 Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 276:48572-48579

462. **Fonseca V** 2003 Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am J Med* 115 Suppl 8A:42S-48S
463. **Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, Sarraf P, Spiegelman BM, Lowell BB** 1997 Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. *J Biol Chem* 272:5283-5290
464. **Sevillano J, de CJ, Bocos C, Herrera E, Ramos MP** 2007 Role of insulin receptor substrate-1 serine 307 phosphorylation and adiponectin in adipose tissue insulin resistance in late pregnancy. *Endocrinology* 148:5933-5942
465. **Sevillano J, de CJ, Bocos C, Herrera E, Ramos MP** 2007 Role of insulin receptor substrate-1 serine 307 phosphorylation and adiponectin in adipose tissue insulin resistance in late pregnancy. *Endocrinology* 148:5933-5942
466. **Sevillano J, de CJ, Bocos C, Herrera E, Ramos MP** 2007 Role of insulin receptor substrate-1 serine 307 phosphorylation and adiponectin in adipose tissue insulin resistance in late pregnancy. *Endocrinology* 148:5933-5942
467. **Caja S, Martinez I, Abelenda M, Puerta M** 2005 Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats. *J Endocrinol* 185:551-559
468. **Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA** 2003 Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300:472-476
469. **Haugen F, Jorgensen A, Drevon CA, Trayhurn P** 2001 Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507:105-108
470. **Bajaj M, Suraamornkul S, Pratipanawatr T, Hardies LJ, Pratipanawatr W, Glass L, Cersosimo E, Miyazaki Y, DeFronzo RA** 2003 Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:1364-1370
471. **Meyer MM, Levin K, Grimmshann T, Perwitz N, Eirich A, Beck-Nielsen H, Klein HH** 2002 Troglitazone treatment increases protein kinase B phosphorylation in skeletal muscle of normoglycemic subjects at risk for the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2691-2697
472. **Smith U, Gogg S, Johansson A, Olausson T, Rotter V, Svalstedt B** 2001 Thiazolidinediones (PPARgamma agonists) but not PPARalpha agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. *FASEB J* 15:215-220
473. **Sevillano J, de CJ, Bocos C, Herrera E, Ramos MP** 2007 Role of insulin receptor substrate-1 serine 307 phosphorylation and adiponectin in adipose tissue insulin resistance in late pregnancy. *Endocrinology* 148:5933-5942
474. **White MF** 2006 Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. *Can J Physiol Pharmacol* 84:725-737
475. **Jiang G, Ias-Yang Q, Biswas S, Li Z, Zhang BB** 2004 Rosiglitazone, an agonist of peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma), decreases inhibitory serine phosphorylation of IRS1 in vitro and in vivo. *Biochem J* 377:339-346
476. **sami-Miyagishi R, Iseki S, Usui M, Uchida K, Kubo H, Morita I** 2004 Expression and function of PPARgamma in rat placental development. *Biochem Biophys Res Commun* 315:497-501
477. **Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y** 2006 The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 249:10-15
478. **Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y** 2006 The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 249:10-15
479. **Chan LY, Yeung JH, Lau TK** 2005 Placental transfer of rosiglitazone in the first trimester of human pregnancy. *Fertil Steril* 83:955-958
480. **Soria A, Bocos C, Herrera E** 2002 Opposite metabolic response to fenofibrate treatment in pregnant and virgin rats. *J Lipid Res* 43:74-81
481. **Wakabayashi I, Shibasaki T, Ling N** 1986 A divergence of plasma growth hormone response between growth hormone-releasing factor and insulin-induced hypoglycaemia among middle-aged healthy male subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 24:279-283
482. **Boden G, Shulman GI** 2002 Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3:14-23:14-23
483. **Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Makimattila S, Yki-Jarvinen H** 2004 Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2169-2176
484. **Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Makimattila S, Yki-Jarvinen H** 2004 Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2169-2176
485. **Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J** 1997 The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789
486. **Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, Reitman ML** 2003 Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis,

- triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 278:34268-34276
487. **He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM** 2003 Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15712-15717
488. **Kelly LJ, Vicario PP, Thompson GM, Candelore MR, Doebber TW, Ventre J, Wu MS, Meurer R, Forrest MJ, Conner MW, Cascieri MA, Moller DE** 1998 Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology* 139:4920-4927
489. **Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM** 1993 Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36:62-67
490. **Ozanne SE, Hales CN** 2002 Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:368-373
491. **Stocker CJ, Arch JR, Cawthorne MA** 2005 Fetal origins of insulin resistance and obesity. *Proc Nutr Soc* 64:143-151
492. **Palanivel R, Sweeney G** 2005 Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin. *FEBS Lett* 579:5049-5054
493. **Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM** 2004 Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 114:224-231
494. **Ozanne SE, Hales CN** 2002 Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:368-373
495. **Gavete ML, Martin MA, Alvarez C, Escriva F** 2005 Maternal food restriction enhances insulin-induced GLUT-4 translocation and insulin signaling pathway in skeletal muscle from suckling rats. *Endocrinology* 146:3368-3378
496. **Agote M, Goya L, Ramos S, Alvarez C, Gavete ML, Pascual-Leone AM, Escriva F** 2001 Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1101-E1109
497. **Sarafidis PA, Nilsson PM** 2006 The effects of thiazolidinediones on blood pressure levels - a systematic review. *Blood Press* 15:135-150
498. **Barker DJ** 2004 The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* 93:26-33