



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Universitat Autònoma de Barcelona

Influencia de la citoquina Interleuquina 6 (IL-6) adipocitaria y muscular en el control del metabolismo

Beatriz Ferrer Villahoz
Bellaterra, mayo de 2013

Memoria de tesis presentada por **Beatriz Ferrer Villahoz** para optar al grado de Doctor en Inmunología por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Doctor **Juan Hidalgo Pareja**, catedrático de universidad del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Director de tesis

Doctoranda

Dr Juan Hidalgo Pareja

Beatriz Ferrer Villahoz

*Quasi nanos, gigantium humeris
insidentis*

Bernardo de Chartres

La historia no se hace cargo de todas esas particularidades; y no puede tampoco hacer otra cosa, porque la invadiría el infinito. Estos detalles que se llaman pequeños -No hay hechos pequeños en la humanidad, ni hojas pequeñas en la vegetación-, son útiles. La figura de los siglos se compone de la fisonomía de los años.

Victor Hugo

Agradecimientos

Parece mentira, pero al final ya ha llegado el momento de escribir los agradecimientos. Una tarea que se me hace difícil, ya que tras este trabajo hay mucha gente que ha hecho que este viaje sea posible. En primer lugar quiero agradecer al Dr Juan Hidalgo la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación y la confianza depositada en mi para realizar esta tesis.

Que días aquellos de interminables ITT y OGTT, cómo fuimos aprendiendo con cada experimento, esas matanzas interminables en las que incluso el jefe llegó a ponerse la bata, y que no hubieran sido posibles sin la ayuda de mis compañeros . Dar las gracias a la *tieta* Mercè por su buen humor y por poder contar con ella siempre que ha sido necesario; a Gemma que siempre está dispuesta a ayudar y con quien aprendí a dar mis primeros pasos por el *estabulario*, a Maria que no sé si recordará las mil horas en el citómetro de flujo diseñando camisetas frikies que nunca llegamos a hacer; a Amalia por estar siempre dispuesta a compartir los nuevos artículos que ha encontrado y técnicas que ha aprendido y en especial a mis compañeros de despacho a Yas por sus consejos que siempre fueron útiles, a Javier por su infinita paciencia y por estar ahí siempre que surge una duda por pequeña que sea y a Olaya, que siempre tiene una idea con la que te alegra el día, por su creatividad científica y artística.

Por nuestro grupo también han pasado muchos estudiantes (Mónica, Rosa, Gara, Lena, Marco, Nuria, Silvia, Natalia, Ajna, Magda) que de alguna manera o otra han colaborado con este proyecto, gracias por vuestras PCRs, glucógenos e inmunos.

No quiero olvidarme de Pilar, Neus y Sandra, por su ayuda en el día a día del laboratorio y con los animales, y de Olga, Carlota y Paqui, por su ayuda administrativa especialmente con los pedidos, ya que considero que el trabajo que realizan es muy importante, muchas gracias.

Tampoco voy a olvidarme del resto de compañeros de la unidad, tanto los que aún están como los que se han ido, gracias por esos ratos durante las comidas en el seminario, las jamonadas, vinachos y fiestas, en los que no sólo hemos compartido ciencia sino también ratos muy divertidos.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de muchas personas. Por lo que quiero agradecer al Dr Albert Quintana todo el trabajo realizado para obtener el ratón floxado. Al Dr Richard Palmiter por darnos el constructor de IL-6 para obtener el ratón floxado. A Dr Benoit Viollet por cedernos el ratón FLP. Al Dr Steve Burden por el ratón mlc-Cre y al Dr Pierre Chambon por el ratón aP2-Cre-ERT2. También quiero agradecer las colaboraciones con el Dr Antonio Serrano y la Dra Pura Muñoz que realizaron un gran trabajo en el estudio de las fibras musculares del ratón mL-6 y el trabajo realizado por la Dra Rosa Señarís y Belén Navia por el análisis de los neuropéptidos hipotalámicos.

Pero este viaje empezó mucho antes, por lo que también quiero agradecer a la gente del laboratorio de inmunología del Hospital de Sant Pau donde di mis primeros pasos en la ciencia. En especial quiero agradecer al Dr Cándido Juárez por haberme dado la oportunidad de tener mis primeras publicaciones y presentar la tesina; a la Dra Silvia Vidal por abrirme las puertas de la ciencia y por los ánimos que siempre me da; a Juan por pasarme la oferta de trabajo que ha permitido que presente esta tesis y a Cecilia por ser tan buena amiga.

Y como no, a mis amigos judokas (Carlos, Currito, José María (son ratones), Marc, Edu, Ferran, Joan Miquel...) por hacerme más llevadero marcar este *ippon* y a los menos deportistas (Anna, Luís, David, Ester, Rosa...) por haberme acompañado en este viaje. Y por último, pero no menos importante, quiero agradecer el apoyo de mi familia, en especial por estos últimos meses, ya que sin su ayuda este viaje no hubiera alcanzado su fin. Muchas gracias Marta y muchas gracias mamá ya que sin ti no hubiera llegado hasta aquí, espero que éste sea un buen regalo de cumpleaños.

Todo viaje siempre llega a su fin, ¡pero que viaje tan alucinante! Gracias por haber hecho que sea posible.

Abreviaciones

aa	Aminoácido
Acaca	Gen de la acetil CoA Carboxilasa
ACC	Acetil CoA carboxilasa
AgRP	Proteína relacionada con agoutí
aIL-6 KO	<i>Knock-out</i> condicional para la IL-6 en tejido adiposo
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
aP2	Proteína adiposa de unión a ácidos grasos 2
ARC	Núcleo arcuato
BAT	Tejido adiposo marrón
BHE	Barrera hematoencefálica
Ccl2	Ligando de quimiocinas CC 2
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Retículo endoplasmático
FAS	Sintasa de ácidos grasos
Fasn	Gen de la sintasa de ácidos grasos
G6pasa	Glucosa-6-fosfatasa
G6pc	Gen de la Glucosa-6-fosfatasa
GEE	Ecuaciones estimadas generalizadas
GFAP	Proteína glial fibrilar acídica
GLZ	Modelo lineal generalizado
gp130	Glicoproteína 130
HB	<i>Hole board</i>
HFD	Dieta alta en grasas
icv	Inyección intracerebroventricular
IL	Interleuquina
IL-6 KO	<i>Knock-out</i> total para la IL-6
IL-6R	Receptor de la interleuquina 6
ip	Inyección intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
ITT	Test de tolerancia a la insulina
Lep	Leptina
LHA	Área hipotalámica lateral
LPL	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCH	Hormona concentradora de melanina
MCP1	Proteína quimioatrayente de macrófagos

mIL-6 KO	<i>Knock-out</i> condicional para la IL-6 en músculo esquelético
mIL-6R	Receptor de la IL-6 unido a membrana
mlc	Cadena ligera de la miosina
MSH	Hormona estimulante del melanocito
NPY	Neuropéptido Y
NSE	Enolasa específica de neurona
OGTT	Test de tolerancia a la glucosa
ORO	Aceite de rojo O
Pck1	Gen del fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFA	Paraformaldehido
PFK	Fosfofructoquinasa
Pfkl	Gen de la fosfofructoquinasa del hígado
Pfkm	Gen de la fosfofructoquinasa del músculo esquelético
PGC1	Coactivador del receptor activado por proliferador de peroxisomas γ
POMC	Proopiomelanocortina
Ppargc1a	Coactivador del receptor activado por proliferador de peroxisomas γ
PVN	Núcleo paraventricular
RT-PCR	PCR en tiempo real
SEM	Error estándar de la media
sgp 130	Forma soluble de la glicoproteína 130
sIL-6R	Receptor soluble de la IL-6
SNC	Sistema nervioso central
TG	Triglicéridos
TNF	Factor de necrosis tumoral
UCP1	Proteína desacoplante 1
UCP2	Proteína desacoplante 2
WAT	Tejido adiposo blanco
WB	<i>Western blot</i>
WT	<i>Wild type</i>

Índice

1. Introducción	1
1.1. Interleuquina 6	1
1.1.1. El receptor de la IL-6.....	3
1.1.2. Vías de señalización.....	7
1.2. IL-6 en el sistema inmune.....	11
1.3. El músculo esquelético y la secreción de mioquinas.....	13
1.4.1. La IL-6: una mioquina que responde al ejercicio.....	17
1.4. El tejido adiposo y las adipoquinas.....	24
1.4.1. Tejido adiposo marrón (BAT).....	27
1.4.2. Tejido adiposo blanco (WAT).....	27
1.4.3. Adipoquinas.....	30
1.4.3.1. La IL-6: una adipoquina que responde a los cambios de masa corporal.....	34
1.4.3.1.1. La IL-6 y la obesidad.....	35
1.4.3.1.2. La IL-6 y la resistencia a la insulina.....	40
1.5. La IL-6 en el sistema nervioso central (SNC).....	41
1.5.1. La IL-6 en la neuroinflamación.....	42
1.5.2. La IL-6 como factor neurotrófico.....	44
1.5.3. La IL-6 en el control de la homeostasis energética.....	45
1.6. La IL-6 en el páncreas.....	54
1.7. La IL-6 en el hígado.....	56
1.7.1. La IL-6 en la regeneración.....	57
1.7.2. La IL-6 en la respuesta de fase aguda e inflamación.....	58
1.7.3. La IL-6 y el metabolismo.....	58
1.7.4. La IL-6 y la sensibilidad a la insulina.....	60
1.8. Funciones de la IL-6.....	61
2. Hipotesis y objetivos	67
2.1. Hipotesis.....	67
2.2. Objetivos.....	67
3. Materiales y métodos	72
3.1. Animales.....	72
3.1.1. Ratones floxados para IL-6.....	72
3.1.2. Ratones <i>knock-out</i> condicionales para la IL-6 en músculo esquelético (mIL-6 KO)	73
3.1.3. Ratones <i>knock-out</i> condicionales inducibles para la IL-6 en tejido adiposo (aIL-6 KO)	74
3.1.3.1. Tratamiento con Tamoxifeno.....	76
3.1.4. Mantenimiento de los animales.....	76
3.2. Genotipado de los animales a partir de cola.....	77

3.2.1. Extracción de DNA.....	77
3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	77
3.2.2.1. PCR para detectar el gen de la IL-6 flojado.....	78
3.2.2.2. PCR para mlc-Cre.....	78
3.2.2.3. PCR para aP2-Cre.....	79
3.2.2.4. Procedimiento general de realización de la PCR.....	79
3.2.3. Genotipado de los animales a partir de tejido	81
3.2.3.1. Extracción de DNA.....	81
3.2.3.2. PCR para detectar la delección del exón 2 de IL-6.....	82
3.3. Experimentos	83
3.3.1. Obesidad inducida por una dieta grasa.....	83
3.3.1.1. Dietas.....	83
3.3.1.2. Descripción del experimento de dieta.....	84
3.3.1.2.1. Seguimiento del peso y la ingesta.....	84
3.3.1.2.2. Niveles de glucosa circulante.....	85
3.3.1.2.3. Test de tolerancia a la insulina (ITT).....	85
3.3.1.2.4. Test de tolerancia a la glucosa oral.....	86
3.3.1.3. Respuesta a la insulina.....	86
3.3.2. Exposición al frío.....	86
3.4. Tests de conducta.....	87
3.4.1. Tabla de agujeros (<i>hole board test</i>).....	87
3.4.2. Batería de test sensorimotora.....	88
3.4.2.1. Barra horizontal plana.....	88
3.4.2.2. Barra horizontal circular.....	88
3.4.2.3. Test de la percha.....	89
3.4.3. Barra giratoria (<i>Rotarod test</i>)	90
3.5. Eutanasia de los animales y toma de muestras.	91
3.6. Determinación de metabolitos.....	92
3.6.1. Determinación de metabolitos circulantes: triglicéridos, colesterol y glucosa.....	92
3.6.2. Determinación de hormonas circulantes: Insulina y leptina.....	93
3.7. Análisis histológicos.....	93
3.7.1. Esteatosis hepática.....	93
3.7.2. Número y tamaño de los adipocitos.....	94
3.8. Determinación del glucógeno hepático	96
3.9. Extracción de RNA.....	96
3.10. Real Time PCR (RT-qPCR).....	97
3.11. Análisis estadísticos.....	99
4. Resultados.....	103
4.1. <i>Knock-out</i> condicionales para la IL-6 en músculo esquelético.....	103

4.1.1. Caracterización en condiciones basales.....	103
4.1.1.1. Efecto de la deficiencia de IL-6 muscular en la supervivencia.....	103
4.1.1.2. Efectividad de la delección del exón 2 por la recombinasa Cre.....	104
4.1.1.3. Efecto de la deficiencia de IL-6 muscular sobre la capacidad sensorimotora.....	105
4.1.1.4. Resistencia a la temperatura.....	107
4.1.2. Obesidad inducida por dieta grasa.....	108
4.1.2.1. Evolución del peso.....	109
4.1.2.2. Seguimiento de la ingesta.....	112
4.1.2.3. Tejidos.....	114
4.1.2.3.1. Peso de los tejidos.....	114
4.1.2.3.2. Análisis de los adipocitos.....	118
4.1.2.3.3. Esteatosis hepática.....	121
4.1.2.3.4. Tibia y músculo tibialis.....	123
4.1.2.4. Test de hole-board.....	124
4.1.2.5. Determinación de la glucemia.....	125
4.1.2.6. Test de tolerancia a la Insulina (ITT).....	128
4.1.2.7. Test de tolerancia a la glucosa oral (OGTT).....	129
4.1.2.8. Glucógeno hepático.....	130
4.1.2.9. Metabolitos circulantes.....	131
4.1.2.9.1. Glucosa.....	131
4.1.2.9.2. Triglicéridos.....	132
4.1.2.9.3. Colesterol.....	133
4.1.2.10. Hormonas.....	134
4.1.2.10.1. Insulina.....	134
4.1.2.10.2. Leptina.....	135
4.1.2.11. Expresión génica.....	136
4.1.2.11.1. Genes implicados en el metabolismo de la glucosa.....	136
4.1.2.11.2. Genes implicados en el metabolismo de los lípidos.....	138
4.1.2.11.3. Otros genes relacionados con el metabolismo.....	140
4.1.2.11.4. Genes implicados en inflamación.....	142
4.2. <i>Knock-out</i> condicionales para la IL-6 en tejido adiposo	146
4.2.1. Caracterización en condiciones basales.....	146
4.2.1.1. Efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria en la supervivencia....	146
4.1.1.2. Efectividad de la delección del exón 2 por la recombinasa Cre.....	147
4.3.2. Obesidad inducida por dieta.....	149
4.2.2.1. Evolución del peso.....	150
4.2.2.2. Seguimiento de la ingesta.....	151
4.2.2.3. Tejidos.....	153
4.2.2.3.1. Peso de los tejidos.....	153
4.2.2.3.2. Análisis de los adipocitos.....	155
4.2.2.3.3. Esteatosis hepática.....	157
4.2.2.3.4. Tibia y tibialis.....	158

4.2.2.4. Determinación de la glucemia.....	159
4.2.2.5. Test de tolerancia a la Insulina (ITT).....	161
4.2.2.6. Test de tolerancia a la glucosa oral.....	161
4.2.2.7. Glucógeno hepático.....	163
4.2.2.8. Metabolitos circulantes.....	164
4.2.2.8.1. Basales.....	164
a) Glucosa.....	164
b) Triglicéridos.....	164
c) Colesterol.....	164
4.2.2.8.2. Tras la administración de glucosa después de un ayuno de 18h	
.....	165
a) Glucosa.....	165
b) Triglicéridos.....	165
c) Colesterol.....	165
4.2.2.9. Hormonas.....	166
4.2.2.9.1. Insulina.....	166
4.2.2.9.2. Leptina.....	167
4.2.2.10. Expresión génica.....	168
4.2.2.10.1. Genes implicados en el metabolismo de la glucosa.....	168
4.2.2.10.2. Genes implicados en el metabolismo de los lípidos.....	170
4.2.2.10.3. Otros genes relacionados con el metabolismo.....	171
4.2.2.10.4. Genes implicados en inflamación.....	174
5. Discusión.....	181
5.1. <i>knock-out</i> condicionales para la IL-6 en músculo esquelético y tejido adiposo	
.....	181
5.2. Peso corporal: obesidad inducida por dieta.....	186
5.3. Ingesta.....	190
5.4. Control central de la ingesta. Neuropeptidos hipotalámicos.....	191
5.5. Homeostasis de la glucosa.....	195
5.6. Homeostasis de los lípidos.....	202
5.7. Inflamación.....	203
5.8. Termogénesis.....	205
5.9. Dimorfismo sexual.....	206
6. Conclusiones.....	211
7. Bibliografía.....	219

1. Introducción

1. Introducción

1.1. Interleuquina 6

Hacia el final de la década de 1960 se describió que las células T jugaban un papel esencial en la producción de anticuerpos, por lo que se planteó la hipótesis de que ciertas moléculas producidas y liberadas por estas células estimularían a las células B para que produjeran anticuerpos (Kishimoto, 2006; Miller and Mitchell, 1968). No fue hasta 1985 cuando se identificó una molécula descrita como el factor estimulador 2 de células B (Hirano et al., 1985). Simultáneamente se clonó y estudió en varios laboratorios, donde se le dio otros nombres como por ejemplo interferón β 2 (por su parecido con el interferón); factor de crecimiento hibridoma/plasmacitoma (por su capacidad de estimular el crecimiento del plasmacitoma murino) o factor estimulante del hepatocito (por su papel en la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado). Finalmente, en 1989, se descubrió que estas proteínas eran iguales en el número de aminoácidos y en la secuencia nucleotídica, por lo que se unificaron los criterios y se le dio el nombre de interleuquina -6 (IL-6).

Esta citoquina es el miembro fundador de las neuropoyetinas, que también incluye la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la oncostatina M, el factor inhibidor ciliar, la cardiotropina 1, la citoquina tipo cardiotropina (conocida también como neurotrofina 1 y factor estimulador 3 de células B), la neuropoyetina, la IL-27, la IL-31 y el factor neurotrófico ciliar (Bauer et al., 2007; Heinrich et al., 2003; Scheller et al., 2011; Taga and Kishimoto, 1997; Wang et al., 2009).

El gen de la IL-6 humana se localiza en el cromosoma 7 (Sehgal et al., 1986) y en el caso de la IL-6 murina se halla en el cromosoma 5 (Mock et al., 1989). Se han clonado los genes para la IL-6 en humanos (Yasukawa et al., 1987; Zillberstein et al.,

Introducción

1986), en ratón (Tanabe et al., 1988) y en rata (Northemann et al., 1989) y en todos los casos el gen contiene cuatro intrones y cinco exones (Simpson et al., 1997) (fig 1.1). La región que codifica para la proteína está relativamente conservada entre las diferentes especies. En el caso del gen humano y del murino la homología es del 65%.



Fig 1.1: Gen de la IL-6 de ratón. Organización del gen de la IL-6 murino. En números se indica el tamaño de sus intrones y exones en pares de bases. El número en negrita indica el tamaño de la secuencia codificante. Se indican también las enzimas de restricción. Figura adaptada de Bird et al., 2005.

En el caso del gen de la IL-6 humana, codifica para una proteína de entre 21 y 28 KDa dependiendo de las modificaciones postraduccionales (de su estado de glicosilación y de fosforilación) (May et al., 1988; Van Snick, 1990) y está formada por 212 aminoácidos. Por lo que respecta a la IL-6 murina, oscila entre 22 y 29 KDa (Nordan et al., 1987). En esta ocasión la proteína resultante está formada por 211 aminoácidos y a diferencia de la IL-6 humana no se encuentra N-glicosilada (Van Snick, 1990). Entre estas dos proteínas hay una homología del 42 % (fig 1.2).

```

IL6_MOUSE      1 MKFLSARDFHPVAF-LGLMLVTTTAFPTSQVRRGDFTEITPNR-PVYTTTSQVGGILITHV
IL6_HUMAN      1 MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYI
      * * * * *

IL6_MOUSE      59 LWEIVEMRKELCNGNSDCMNDALAEENLKLPEIQRNDGQYQTYGYNQEIICLLKISSGLL
IL6_HUMAN      61 LDGISALRKETCNKSNMCESKEALAENNLNLPMAEKDGCFCQSGFNEETCLVKIITGLL
      * * * * *

IL6_MOUSE      119 EYHSYLEYMKNNLKNKDKARVLQRDTETLIHIFWQEVKDLHKIVLPTPISNALLTDKL
IL6_HUMAN      121 EFEVYLEYLQNRN-ESSEQARAVQMSKVLIQFLQKAKNLDIAITTPDPPTNASLLTKL
      * * * * *

IL6_MOUSE      179 ESQKEWLRTKTIQFILKSLEEFKVTLRSTRQ
IL6_HUMAN      180 QAQNQLQDMTTHLILRSFKFELQSSLRALRQ
      * * * * *
    
```

Fig 1.2: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína IL-6 murina y humana. La comparación se ha realizado usando la herramientas de alineamiento de ExPASy (SIM – Alignment tool as ExPASy (Génova, Suiza)).

La estructura de esta proteína se caracteriza por poseer cuatro hélices alfa (A, B, C y D) ordenadas formando una topología *up-up-down-down*. La unión de las hélices es posible gracias a un bucle largo que une las hélices A y B, uno corto entre las hélices B y C y finalmente un segundo bucle largo entre las hélices C y la D (Somers et al., 1997; Xu et al., 1997). Fuera del haz que contiene estas cuatro hélices principales hay una pequeña hélice adicional, la hélice E (Somers et al., 1997; Xu et al., 1997) (fig 1.3).

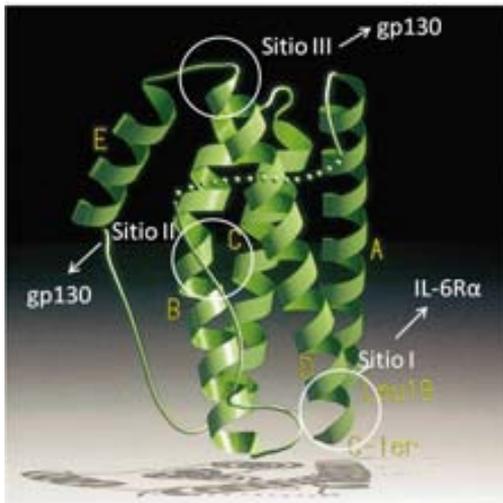


Fig 1.3: Representación de la estructura de la IL-6. Las cuatro hélices principales están marcadas como A, B, C y D. La hélice extra al final del bucle está marcada como E. Se muestran también los sitios de unión al receptor. Figura adaptada de Somers et al., 1997.

1.1.1. El receptor de la IL-6

La actividad biológica de la IL-6 está mediada por dos moléculas: el receptor de IL-6 (IL-6R) y una proteína transmembrana de tipo I de 130 kDa (gp130). El IL-6R es una glicoproteína transmembrana de tipo I de 80 kDa (también conocido como IL-6R α , gp80 o CD126) que no tiene actividad enzimática intrínseca y una vez unido a la IL-6 forma un heterotrímero con gp130 (también llamada IL-6R β o CD130) responsable de la transducción de señales (Assier et al., 2010; Scheller et al., 2011; Taga and Kishimoto, 1997; Yamasaki et al., 1988).

El IL-6R se expresa en pocos tipos celulares principalmente en hepatocitos,

Introducción

leucocitos, células B activadas, células T y músculo esquelético (Eulendorf et al., 2012; Keller et al., 2005; Simpson et al., 1997). Está formado por un péptido señal, una región extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto (Varghese et al., 2002; Yamasaki et al., 1988). La región extracelular contiene tres dominios (D1, D2 y D3). El dominio N-terminal D1 es característico de la superfamilia de las inmunoglobulinas y los dominios D2 y D3 son homólogos a los dominios de unión a citoquinas (CBD) y consisten en dos dominios tipo fibronectina III (Varghese et al., 2002). Este receptor tiene en común con otros receptores de citoquinas de tipo I el dominio N-terminal de los CBD (D2), que tiene cuatro cisteínas conservadas y una región rica en prolina, y el dominio C-terminal (D3) con una secuencia conservada "WSXWS" (Kishimoto et al., 1995). Una de las diferencias fundamentales entre el IL-6R humano y murino es que en el caso de este último el dominio tipo Ig es fundamental, ya que su ausencia impide la unión de la IL-6 (Wiesinger et al., 2009), mientras que en el caso del IL-6R humano, este dominio no es necesario para el reconocimiento del ligando ni para la ruta de señalización (Yawata et al., 1993), pero está implicado en la interiorización del receptor y su estabilidad (Ozbek et al., 1998; Vollmer et al., 1999). Por otro lado, los dominios transmembrana y citoplasmático del IL-6R no son necesarios para la transducción de la señal de la IL-6.

La proteína transductora de señales gp130, a diferencia del IL-6R, se expresa de forma ubicua en prácticamente todas las células (Rose-John and Heinrich, 1994; Scheller and Rose-John, 2006). Es una proteína del complejo de señalización de la IL-6 y del resto de miembros de su familia (Scheller and Rose-John, 2006). Posee 6 dominios extracelulares, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (Scheller et al., 2011). También tiene un dominio N-terminal tipo Ig seguido de dos dominios de unión a citoquinas (dominio 2 y 3) y tres dominios tipo fibronectina (dominios 4 a 6).

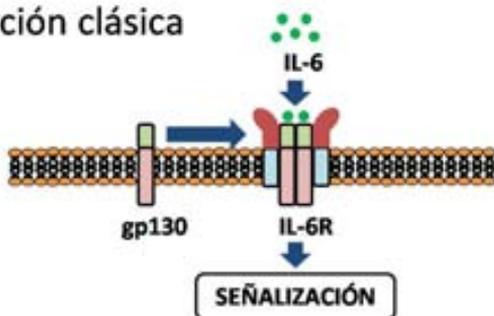
La IL-6 tiene tres sitios diferentes de unión al receptor. El sitio 1 está formado por los residuos C-terminales de la hélice D y los residuos C-terminales de la parte del bucle AB y determina la unión específica a IL-6R. El sitio 2 está formado por residuos localizados en medio de las hélices A y C y el sitio 3 contiene los residuos localizados en el extremo N-terminal del bucle AB (sitio 3a) y los residuos del extremo C-terminal de la hélice D (sitio 3b). Tanto el sitio 2 como el 3 son necesarios para reclutar dos moléculas de gp130 (Boulanger et al., 2003; Scheller et al., 2011) (fig 1.3).

Tanto el IL-6R (Schuster et al., 2003) como la gp130 (Giese et al., 2005; Tenhumberg et al., 2006) existen en forma de dímeros inactivos preformados en la membrana plasmática. Estudios funcionales y estructurales sugieren que la IL-6 forma un complejo de señalización hexamérico que contiene dos moléculas de IL-6, dos de IL-6R y dos de gp130 (Boulanger et al., 2003) (fig 1.4a).

Uno de los reguladores principales de la señalización de las citoquinas es la existencia de receptores solubles (Scheller et al., 2011). La forma soluble del IL-6R (sIL-6R) se une a la IL-6 con una afinidad comparable a la del IL-6R unido a la membrana (mIL-6R). Este receptor es generado por proteólisis limitada de la forma transmembrana o por *splicing* alternativo del mRNA del IL-6R (fig 1.4b). A diferencia de la mayoría de los receptores solubles de citoquinas y factores de crecimiento, el sIL-6R no sólo se une a su ligando (la IL-6), sino que el complejo de IL-6/sIL-6R también puede unirse y activar la gp130 (Scheller and Rose-John, 2006), la cual se encuentra en la superficie de prácticamente todas las células del organismo. De este modo, aunque la expresión del IL-6R está restringida a unas pocas células, la existencia de la forma soluble permite que células que no expresan el IL-6R respondan a la IL-6. Este mecanismo se conoce como trans-señalización (Assier et al., 2010; Mackiewicz et al., 1992; Peters et al., 1998; Rose-John and Heinrich, 1994) (fig 1.4b).

Introducción

A. Señalización clásica



B. Trans-señalización

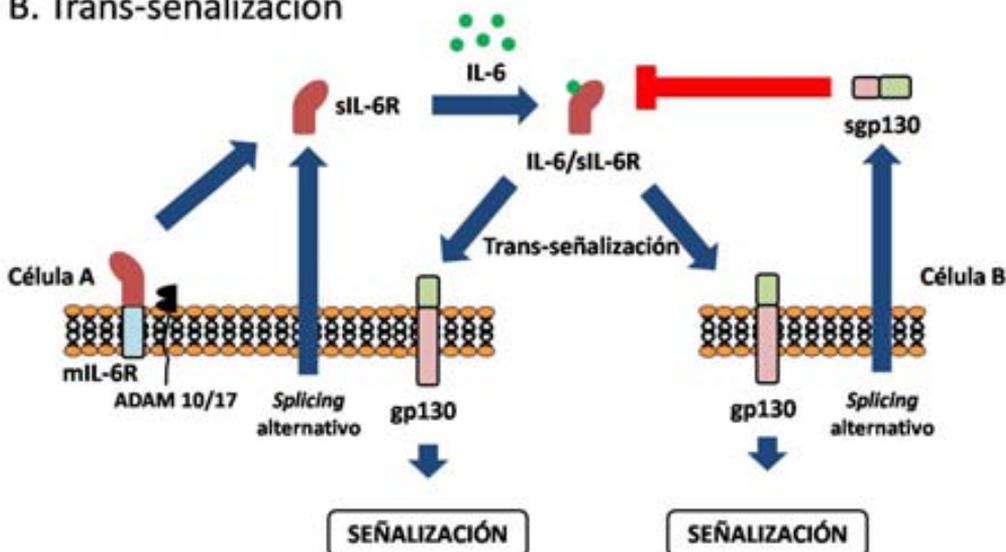


Fig 1.4: Señalización de la IL-6. A. Señalización clásica a través del receptor en la forma de membrana. B. Trans-señalización. La IL-6 puede unirse al IL-6R tanto a la forma de membrana (activación clásica) como a la forma soluble (trans-señalización). En ambos casos el complejo que se forma puede unirse a la gp130 expresada ubicuamente. También se libera una forma soluble de gp130 (sgp130) que inhibirá la trans-señalización. Esquema adaptado de Erta et al., 2012.

El mecanismo para obtener el sIL-6R por *splicing* alternativo (Horiuchi et al., 1998; Oh et al., 1996) genera un mRNA que ha perdido los dominios citosólicos y transmembrana de manera que se obtiene una nueva secuencia C-terminal en la proteína que no afecta a las propiedades biológicas del sIL-6R. Este *splicing* alternativo del mRNA para obtener el sIL-6R se ha descrito únicamente en humanos. En ratón no

se han encontrado indicios de este mecanismo, lo que indicaría que la forma circulante de sIL-6R está generada exclusivamente por proteólisis del mL-6R (Scheller et al., 2011). Por otro lado, la proteólisis del mL-6R es catalizada por metaloproteasas de la familia ADAM (Chalaris et al., 2010; Matthews et al., 2003) que son proteínas transmembrana de tipo I implicadas en la proteólisis de muchos receptores de citoquinas. El IL-6R es el sustrato de la ADAM17 y de la ADAM10. Aparentemente, la ADAM10 es la responsable de la liberación constitutiva lenta del IL-6R, mientras que la ADAM 17 causaría una proteólisis rápida (Matthews et al., 2003).

La proteína transductora de señales gp130 también puede encontrarse de forma soluble en la circulación a una concentración relativamente alta (100–400 ng/ml en humanos (Narazaki et al., 1993; Tanaka et al., 2000)). La forma soluble de la gp130 (sgp130) se produce principalmente por *splicing* alternativo (Mullberg et al., 1993). La sgp130 puede unirse al complejo IL-6/sIL-6R en la circulación y actúa como inhibidor específico de la trans-señalización mediada por IL-6 (Assier et al., 2010; Jostock et al., 2001; Kishimoto, 2006) (fig 1.4b). A pesar de esto, la señalización clásica a través del IL-6R unido a membrana no se ve afectada por la sgp130 (fig 1.4).

1.1.2. Vías de señalización

En 1994 se descubrió que las citoquinas de la familia de las IL-6 utilizan tirosin-quinazas de la familia de las Jano quinazas (JAK) y factores de transcripción de la familia de los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) como principales mediadores de la transducción de señales (fig 1.5) (Heinrich et al., 2003; Luttkicken et al., 1994; Stahl et al., 1994) una característica que comparten con los interferones y otras familias de citoquinas y factores de crecimiento. Una vez la IL-6 se ha unido al complejo del receptor se inicia la activación de proteínas tirosin-quinazas de la familia de JAK: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2 (Stark and Darnell, 2012). Mientras que

Introducción

JAK1, JAK2 y Tyk2 se expresan de forma ubicua, la expresión de JAK3 está restringida a células del linaje hematopoyético y células musculares de la vasculatura (Gurniak and Berg, 1996; Musso et al., 1995; Verbsky et al., 1996). Estas enzimas están constitutivamente asociadas con la subunidad gp130 (Eulendorf et al., 2012; Luttkien et al., 1994; Stahl et al., 1994). La activación de JAK lleva a la fosforilación de tirosinas de los receptores de tirosinas lo que permitirá el reclutamiento de las STATs. Hay siete proteínas STATs diferentes: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6 (Curiel et al., 1997; Fu et al., 1992; Gerhartz et al., 1996; Ihle and Kerr, 1995; Kiu and Nicholson, 2012; Mui et al., 1995; Schindler et al., 1992; Yamamoto et al., 1994; Zhong et al., 1994). La STAT1 se expresa con altos niveles en corazón, timo y bazo. STAT4 se encuentra principalmente en testículos, timo y bazo (Herrada and Wolgemuth, 1997; Zhong et al., 1994), mientras que STAT5a y 5b tienen una expresión diferencial en músculo, cerebro, glándulas mamarias y órganos secretores (vesículas seminales y glándulas salivares) y STAT2, 3 y 6 se hayan en la mayoría de tejidos (Hou et al., 1994; Zhong et al., 1994).

En la señalización por IL-6 los cuatro motivos fosfotirosina de la gp130 más distales de la membrana (Y767, Y814, Y905, Y915) son sitios de reclutamiento para STAT3 (Gerhartz et al., 1996; Stahl et al., 1995) y los dos situados más cerca de la zona C-terminales (Y905, Y915) reclutan adicionalmente STAT1 (Gerhartz et al., 1996). Posteriormente, las STATs también se fosforilan, forman dímeros y se translocan al núcleo, donde regulan la transcripción de genes diana. La tirosina fosfatasa SHP2 también se une a la gp130 fosforilada, de este modo permite que se forme un nexo con la vía de la proteína quinasa activadora de mitógenos (MAPK), que también está activada por la estimulación por citoquinas del tipo IL-6. Otras vías activadas por esta citoquina serían la del PI·(fosfatidil inositol) 3 quinasa o IRS (substrato del receptor de insulina) (Boulangier et al., 2003; Eulendorf et al., 2012) (fig 1.5).

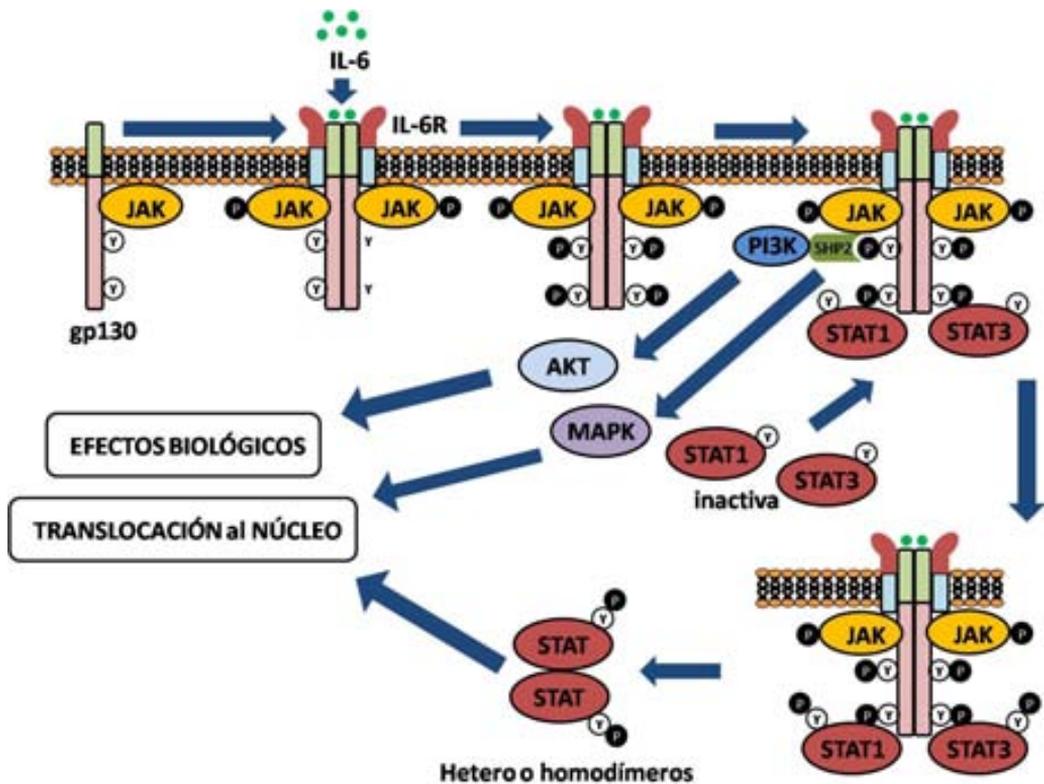


Fig 1.5: Vías de señalización activadas por IL-6. Las moléculas gp130 asociadas a JAK se fosforilan por la parte citoplasmática de manera que se crean sitios de anclaje para las STAT1 y STAT3 que se fosforilan y forman homo- o heterodímeros que serán translocados al núcleo donde regularán la expresión de genes. Las cascadas de MAPK y the PI3K se activan a través de la unión a la proteína SHP2 que se une a la cola citoplasmática fosforilada de gp130. Esquema adaptado de Heinrich et al., 1998.

Las STATs se activan en el citoplasma, pero ejercen su función en el núcleo. Por consiguiente, después de la fosforilación de tirosinas son transportadas dentro del compartimento nuclear. El transporte de macromoléculas de dentro a fuera y de fuera a dentro del núcleo es un proceso mediado por señales que requiere de energía. Las proteínas que se transportan al núcleo presentan una secuencia de localización nuclear (NLS) que normalmente es un motivo corto caracterizado por un grupo de aminoácidos básicos. Este NLS es reconocido por el receptor de NLS importina α , que junto a importina β median el acoplamiento de la proteína a transportar a la cara

Introducción

citoplasmática del complejo del poro nuclear. La proteína que contiene el NLS, junto a las importinas se transloca a través del poro, un paso que requiere de la GTPasa Ran y de la hidrólisis de GTP (Gorlich and Mattaj, 1996).

El sitio de unión a la importina α de STAT1 está localizado en una señal de localización nuclear específica inusual dentro del dominio de unión al DNA (Fagerlund et al., 2002; McBride et al., 2002; Meyer et al., 2002) que se comporta como una secuencia NLS atípica ya que contiene menos residuos con cargas positivas. La STAT3 posee una secuencia homóloga a la descrita que también funciona como NLS (Ma et al., 2003). Además se ha descrito que los homodímeros fosforilados de STAT1 y los heterodímeros STAT1-STAT2 interaccionan con la importina α para ser translocados al núcleo (Meyer and Vinkemeier, 2007; Sekimoto et al., 1997).

Después de la dimerización y la translocación al núcleo de las STATs, éstas se unen a potenciadores de secuencia específicos y estimulan o bien, en ciertos casos, reprimen la transcripción de los genes diana.

La IL-6 es esencial para la regulación de los procesos inmunes, aunque la sobreproducción de citoquinas lleva a la inflamación y a la enfermedad (como la artritis reumatoide, la enfermedad de Chron...). Como resultado esta citoquina debe ser regulada controlando la duración y la magnitud de la respuesta (Kishimoto, 2006).

Los sistemas de señalización de la IL-6 están regulados por un *feedback* negativo por supresores de la señalización de las citoquinas (SOCS) y proteínas inhibitoras de las STATs activadas (PIAS). SOCS-1, SOCS-2 y SOCS-3 están inducidas por varias citoquinas incluyendo IL-6, IFN- γ , IL-4 y factor granulocítico estimulante de colonias entre otros e inhiben la vía de señalización JAK/STAT. SOCS-1 interacciona directamente con JAKs y inhibe su actividad catalítica (Yasukawa et al., 1999), mientras

que SOCS-3 inhibe la señalización de las citoquinas por la unión al complejo del receptor (Sasaki et al., 1999).

Las PIASs son una familia de reguladores de STATS que se expresan constitutivamente. Existen 4 miembros (PIAS 1, 2, 3 y 4). PIAS1 inhibe la expresión de genes mediada por STAT1 (Liu et al., 1998), mientras que PIAS-3 se asocia especialmente a STAT3, de manera que bloquea la expresión de los genes mediada por ésta (Chung et al., 1997). La expresión constitutiva de las proteínas PIAS implica que su rol fisiológico es diferente del de las proteínas SOCS, las cuales se inducen de manera transitoria por la estimulación por citoquinas (Kishimoto, 2006).

1.2. IL-6 en el sistema inmune

El sistema inmune es esencial para la supervivencia; reconoce y elimina virus, bacterias y otros patógenos. En este contexto, la primera función descubierta de la IL-6 fue en la diferenciación de las células B en células secretoras de anticuerpos (Muraguchi et al., 1981). En 1994 se mostró que ratones deficientes en IL-6, aunque se desarrollan con normalidad, muestran una respuesta alterada a las infecciones, con defectos severos en la producción de anticuerpos regulada por células T y la abolición de la respuesta de fase aguda orquestada en el hígado tras la infección y el trauma (Kopf et al., 1994).

La inflamación es un mecanismo complejo de defensa en el que los leucocitos migran de la vasculatura hacia el tejido dañado para destruir los agentes que potencialmente causan el deterioro del tejido. La inflamación aguda es una respuesta limitada beneficiosa, mientras que la inflamación crónica es un fenómeno persistente que llevará a dañar el tejido. En una situación inflamatoria se producen varias señales, de entre ellas la IL-6 es la que se detecta primero en el suero y es responsable de

Introducción

producir la fiebre y de la respuesta de fase aguda en el hígado (Chai et al., 1996; Kopf et al., 1994). La principal fuente de producción de IL-6 son los monocitos y los macrófagos durante la inflamación aguda y las células T durante la inflamación crónica. El factor de necrosis tumoral (TNF) α , la IL-1, productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), infecciones virales o productos liberados por células necróticas disparan la producción de IL-6 (Naugler and Karin, 2008). Esta citoquina tiene un efecto dual, a ciertos niveles actúa como un mecanismo de defensa, pero en la inflamación crónica actúa como un factor proinflamatorio. Los niveles de IL-6 correlacionan con la severidad de la sepsis y la mortalidad (Hack et al., 1989). Durante la inflamación aguda se reclutan leucocitos, principalmente neutrófilos. Cuando la inflamación se resuelve la población de leucocitos reclutada cambia principalmente de neutrófilos a monocitos. Esta transición es regulada por la IL-6. Otra de las funciones que realiza es la activación y el control de la infiltración de neutrófilos (McLoughlin et al., 2003). De esta forma, ratones deficientes en IL-6 muestran mayores infiltrados de neutrófilos y un aumento de la mortalidad tras la administración intraperitoneal de LPS (Xing et al., 1998). En esta situación estos ratones muestran un aumento de hasta tres veces de los niveles de TNF α , lo que sugiere que este incremento actuaría como un mecanismo compensatorio que permite una respuesta normal al LPS en ausencia de la IL-6 (Fattori et al., 1994; Xing et al., 1998). Estos datos muestran que la IL-6 funciona más como una citoquina antiinflamatoria que como proinflamatoria.

La IL-6 es una señal clave en la transición de la respuesta inicial innata a la infección hacia la respuesta inmune adaptativa y juega un papel importante en la regulación del paso de células T nativas a células supresoras (T reguladoras) o activadoras (T helper). Se ha descrito que la IL-6 modula el balance entre células Th1 y Th2. Promueve la diferenciación de las células Th2 e inhibe la diferenciación de las células Th1. También bloquea la actividad de las células T reguladoras y promueve el

el desarrollo de las células T helper 17 (TH17) (Bettelli et al., 2006) que están implicadas en el desarrollo de estados de inflamación crónica y de las enfermedades autoinmunes.

Con respecto al papel de la IL-6 en la diferenciación de las células B en células productoras de anticuerpos, éste se da indirectamente a través de la estimulación de la producción de IL-21 por las células T CD4 (Diehl et al., 2012; Dienz et al., 2009). La IL-21 promueve la diferenciación de las células B e incrementa la producción de inmunoglobulinas. Las células B presentan menos cantidad de receptores de IL-6 que las células T CD4, pero presentan un aumento de receptores de IL-21 lo que estaría en concordancia con el papel indirecto de la IL-6 en la inducción de la producción de anticuerpos en las células B (Dienz et al., 2009).

La IL-6 es la principal estimuladora de la producción de la mayoría de las proteínas de fase aguda en el hígado (Gauldie et al., 1987), que son un set de proteínas plasmáticas con concentraciones que aumentan (proteínas de fase aguda positivas) o disminuyen (proteínas de fase aguda negativas) en situaciones inflamatorias. También actúa como un factor de crecimiento para las células neoplásicas (mielomas y plasmacitomas), de modo que muchas células mielomatosas que crecen de manera autónoma secretan IL-6 como factor de crecimiento autocrino. Además, la IL-6 puede favorecer el crecimiento de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, que derivan de los mielomas (Bataille et al., 1989).

1.3. El músculo esquelético y la secreción de mioquinas

El músculo esquelético representa aproximadamente el 40% del peso del cuerpo de un hombre o una mujer delgados y constituye el órgano más grande en los individuos que no son obesos. Más de 600 músculos son responsables de la actividad

Introducción

mecánica necesaria para la postura, los movimientos, la respiración y muchas otras actividades que dependen de la contracción de fibras musculares (Trayhurn et al., 2011).

El músculo esquelético deriva de la capa mesodérmica fetal y está formado por haces pequeños llamados fascículos que incluyen miocitos multinucleados, también denominados miotubos o fibras musculares. Estos haces están rodeados de tejido conectivo (perimisio) y cada miofibra está recubierta por una vaina de tejido conectivo (endomisio). Todo el músculo está rodeado por otra capa de tejido conectivo (epimisio), que converge con el perimisio y el endomisio para formar los tendones que unen el músculo con el hueso o con otros tejidos conectivos (fig 1.6). Dentro de las fibras hay varias miofibrillas, que son haces cilíndricos de proteínas contráctiles (actina y miosina principalmente) llamadas miofilamentos. Las proteínas contráctiles se ordenan de forma que permiten la contracción mecánica y a la vez dan la apariencia estriada característica del músculo esquelético. Además de estos miotubos multinucleados hay algunas células mononucleares localizadas bajo la lamina basal de los miotubos llamadas células satélite. Estas células están quiescentes y han de ser activadas. Una vez activadas pueden no sólo reparar los miotubos dañados, sino que también pueden alinearse y formar nuevos miotubos multinucleares (Collins et al., 2005).

En las últimas décadas ha aumentado el número de evidencias que muestran que el músculo esquelético es un importante órgano secretor. Está descrito que durante la actividad física anaeróbica el músculo que realiza contracciones libera grandes cantidades de lactato. También se ha establecido que en situación de ayuno libera acetoacetato, así como los aminoácidos alanina y glutamina, y urea (He et al., 2010).

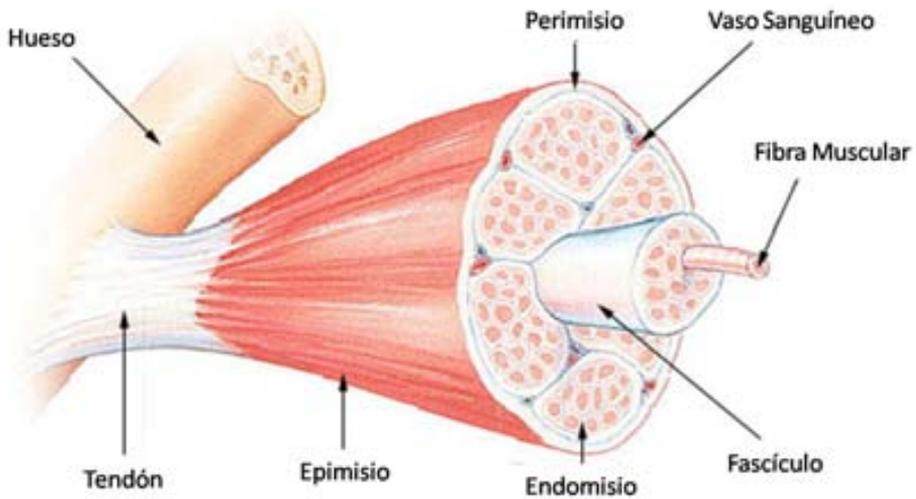


Fig 1.6: Estructura del músculo esquelético. Se observan las fibras musculares así como los fascículos y los diferentes tejidos conectivos que lo forman. Figura extraída de <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/muscular/structure.html>.

Periodos cortos de inactividad física están asociados con cambios metabólicos, como la disminución de la sensibilidad a la insulina, la atenuación del metabolismo lipídico posprandial, la pérdida de masa muscular y la acumulación de tejido adiposo visceral (Krogh-Madsen et al., 2010). Estas alteraciones probablemente representan una conexión entre el ejercicio reducido y el incremento del riesgo de sufrir desordenes progresivos crónicos y mortalidad prematura (Booth et al., 2002). La inactividad física incrementa el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 (Hu et al., 2001; Hu et al., 2004), enfermedades cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer y osteoporosis (Pedersen and Febbraio, 2012). El músculo esquelético media algunos de los efectos protectores del ejercicio, a través de la secreción de proteínas y vía mecanismos que aún se desconocen.

El estudio de la función secretora del músculo esquelético se ha focalizado en

Introducción

factores proteicos (Trayhurn et al., 2011), lo que ha demostrado que las fibras musculares producen y liberan citoquinas y otros péptidos que se han clasificado como mioquinas. Este término se refiere especialmente a las proteínas secretadas por los miocitos y no a las que provienen de otras células que forman el músculo esquelético (Pedersen and Febbraio, 2008; Pedersen et al., 2003; Trayhurn et al., 2011).

Durante cerca de medio siglo, los investigadores han planteado la hipótesis de que las células del músculo esquelético expresarían un factor humoral que sería liberado en respuesta al incremento de la demanda de glucosa durante la contracción muscular, por lo que se ha buscado el nexo entre la contracción muscular y los cambios humorales en forma de un factor que pudiera ser liberado por el músculo esquelético durante la contracción y mediar alguno de los cambios metabólicos inducidos por el ejercicio en otros órganos como el hígado y el tejido adiposo. Este factor se ha sugerido que podrían ser las mioquinas (Pedersen et al., 2007).

Dado que el músculo esquelético es el órgano más grande del cuerpo, la identificación del músculo como un órgano secretor ha creado un nuevo paradigma: los músculos producen y liberan mioquinas que, o bien, trabajan como hormonas y ejercen efectos endocrinos específicos en órganos distantes, o trabajan vía mecanismos autocrinos o paracrinos ejerciendo sus efectos en las vías de señalización del propio músculo (Pedersen, 2009; Pedersen and Febbraio, 2008).

Este descubrimiento da nuevas bases para entender cómo el músculo se comunica con otros tejidos como el tejido adiposo, el hígado, el páncreas, los huesos, el cerebro y el sistema inmunológico. Muchas de las mioquinas identificadas ejercen sus efectos en el propio músculo como por ejemplo la miostatina, LIF, IL-4, IL-6, IL-7 y IL-15 que están implicadas en la hipertrofia muscular y en la miogénesis, o la BDNF y

IL-6 que están involucradas en la oxidación de grasas mediada por AMPK (Pedersen and Febbraio, 2012).

En los últimos años se ha demostrado que el ejercicio induce cambios considerables en el sistema inmune mediante el aumento de la expresión de citoquinas. Estas citoquinas además jugarían un papel en los cambios metabólicos mediados por el ejercicio así como en los cambios metabólicos debidos a la adaptación al entrenamiento del ejercicio. De entre todas las mioquinas que produce el músculo durante la contracción muscular la IL-6 es la más abundante (Febbraio and Pedersen, 2002; Pedersen et al., 2001; Steensberg et al., 2000).

1.3.1. La IL-6: una mioquina que responde al ejercicio

La citoquina IL-6 fue la primera mioquina que se descubrió que se secretaba al torrente sanguíneo en respuesta a la contracción muscular (Pedersen and Febbraio, 2008; Steensberg et al., 2002). Los niveles de IL-6 en plasma aumentan de manera exponencial y proporcional a la duración del ejercicio y a la cantidad de masa muscular que lo realiza, llegando a aumentar hasta 100 veces, aunque normalmente se observan incrementos menos dramáticos (Fischer, 2006; Fischer et al., 2004a; Ostrowski et al., 2000; Steensberg et al., 2000). Así, la IL-6, además de ser sintetizada por células del sistema inmune y adipocitos (Eder et al., 2009), también lo es por mioblastos (De Rossi et al., 2000), cultivos de miotubos humanos (Keller et al., 2006) y células madres musculares asociadas (células satélite) (Serrano et al., 2008).

El músculo esquelético humano en reposo tiene niveles muy bajos de mRNA de IL-6 (Plomgaard et al., 2005) que aumentan con el ejercicio sin que haya señales de daño muscular (Fischer, 2006; Moldoveanu et al., 2000; Starkie et al., 2000; Starkie et al., 2001b; Ullum et al., 1994). Hasta el principio de los 2000, se creía que el

Introducción

incremento en los niveles de IL-6 durante el ejercicio era una consecuencia de una respuesta inmunológica debida a daño local en los músculos que se contraen y se postuló que los macrófagos eran los responsables de este incremento (Bruunsgaard et al., 1997; Nehlsen-Cannarella et al., 1997). Trabajos posteriores mostraron que los niveles de mRNA de IL-6 en monocitos, responsables del aumento de la IL-6 en plasma durante la sepsis, no aumentan como resultado del ejercicio (Moldoveanu et al., 2000; Starkie et al., 2000; Starkie et al., 2001b), por lo que no son los responsables del incremento de IL-6 que se produce durante la actividad física. Hoy se sabe que las células musculares son la fuente principal de la producción de IL-6 durante el ejercicio.

El músculo esquelético puede producir IL-6 durante la contracción muscular de forma independiente del TNF α (Keller et al., 2006), lo que sugiere que la IL-6 muscular en esta situación tiene un papel que está más relacionado con el metabolismo que con la inflamación. Tanto la expresión de mRNA de IL-6 intramuscular como la liberación de la proteína IL-6 (Steensberg et al., 2001) están exacerbados cuando el glucógeno intramuscular está comprometido, sugiriendo que la IL-6 está de algún modo relacionada con el contenido de glucógeno (Steensberg et al., 2001), por lo que trabajaría como un sensor de energía (Febbraio et al., 2003; Hoene and Weigert, 2008; Pedersen and Febbraio, 2012). Numerosos estudios muestran que el incremento plasmático de IL-6 causado por el ejercicio es atenuado por la ingestión de glucosa (Li and Gleeson, 2005; Nehlsen-Cannarella et al., 1997; Nieman et al., 2004; Nieman et al., 2003). Sin embargo, la expresión del mRNA de IL-6 en el músculo esquelético en contracción no parece estar afectada por la ingestión de carbohidratos durante el ejercicio (Febbraio et al., 2003; Starkie et al., 2001a). El hecho de que la ingestión de carbohidratos durante la realización de un ejercicio produzca una disminución de los niveles plasmáticos de la proteína IL-6, pero no una disminución en los niveles de expresión de su mRNA en el músculo esquelético fue algo inesperado.

Podría ser que en el músculo la IL-6 esté sometida a modificaciones postranscripcionales en las que la ingestión de glucosa sí podría influir o bien, que estuviera afectando a los mecanismos de transporte y liberación (Febbraio et al., 2003). Por el contrario, hay otros trabajos en los que sí observan que la ingestión de carbohidratos durante la realización de un ejercicio disminuye tanto los niveles de IL-6 en el plasma, como la expresión del mRNA de IL-6 en el músculo esquelético (Nieman et al., 2003). Estas diferencias podrían ser debidas a diferencias en el protocolo (duración, tipo de ejercicio,...). En conjunto estos resultados sugieren que la liberación de IL-6 por el músculo en contracción durante el ejercicio no sólo depende del tipo y duración de ejercicio, sino que también estaría regulada por la disponibilidad energética (carbohidratos).

Cuando la disponibilidad de carbohidratos está reducida, la respuesta simpaticoadrenal al ejercicio se exagera, y esto sugiere que la adrenalina podría estimular la transcripción del gen de la IL-6 vía estimulación β -adrenérgica de la proteína quinasa A. Experimentos en cultivos *ex vivo* de músculo esquelético de rata incubada a diferentes dosis de adrenalina muestran que aunque a dosis farmacológicas sí se observa un incremento de la expresión de mRNA de la IL-6, a dosis fisiológicas no se da este aumento, además la adrenalina no produce un incremento de la liberación de IL-6 en ningún caso (Holmes et al., 2004). Otra hipótesis es que la contracción muscular podría llevar a la transcripción del gen de la IL-6 vía el calcio liberado por los sacos laterales del retículo sarcoplasmático. De esta manera, cuando células musculares son incubadas con ionomicina se observa un incremento de la expresión del mRNA de IL-6 y de la liberación de la proteína (Holmes et al., 2004). Este incremento se da de manera dependiente del tiempo y de la dosis y es inhibido en presencia del inhibidor de calcineurina ciclosporina A (CSA) (Keller et al., 2006). Por el contrario, la expresión del gen del TNF α disminuye en respuesta al

Introducción

tratamiento con ionomicina, pero aumenta al añadir CSA, lo que muestra que la IL-6 y el TNF α se regulan de manera diferente en respuesta a la estimulación por calcio (Keller et al., 2006).

La adaptación al ejercicio aumenta el contenido preejercicio de glucógeno en el músculo esquelético (Durante et al., 2002; Hickner et al., 1997; Manabe et al., 2013; Putman et al., 1998), inicia la actividad de los enzimas claves en la β -oxidación (Jong-Yeon et al., 2002; Tunstall et al., 2002), incrementa la sensibilidad del tejido adiposo a la lipólisis inducida por adrenalina (Enevoldsen et al., 2000) e incrementa la oxidación intramuscular de triglicéridos (Phillips et al., 1996) (fig 1.10). Como consecuencia, el músculo esquelético entrenado podrá utilizar la grasa como sustrato y de esta manera se vuelve menos dependiente de la glucosa plasmática y del glucógeno muscular como sustratos durante el ejercicio (Phillips et al., 1996). Por otro lado, la inactividad física y el síndrome metabólico se asocian con niveles basales de IL-6 elevados, aunque estos disminuyen después del entrenamiento (Fischer et al., 2004b) tanto el incremento en el plasma como en el músculo esquelético (Fischer et al., 2007).

Mientras que los niveles de IL-6 plasmática en reposo están regulados a la baja por el entrenamiento, la expresión de IL-6R en reposo está regulada al alza. En respuesta a un entrenamiento, el contenido basal de mRNA de IL-6R en el músculo aumenta aproximadamente un 100% (Keller et al., 2005). De este modo, con el entrenamiento, la regulación a la baja de IL-6 está parcialmente contrarrestada por la expresión de IL-6R, con lo que se consigue aumentar la sensibilidad a la IL-6. La inactividad física llevará al músculo esquelético a desarrollar resistencia a IL-6 y a presentar niveles circulantes elevados de IL-6, lo que podría estar relacionado con el desarrollo de la resistencia a la insulina que irá acompañada de hiperinsulinemia y resistencia a la leptina.

El papel que juega la IL-6 en la resistencia a la insulina es muy controvertido. Hay trabajos que muestran una relación de los niveles circulantes de IL-6 con la resistencia a la insulina (Bastard et al., 2002; Pickup et al., 1997) y otros no (Carey et al., 2004; Petersen et al., 2004). Al administrar IL-6 a pacientes diabéticos los niveles de insulina en la sangre disminuyen hasta los niveles que muestran los individuos sanos usados como control (Petersen et al., 2005). En cambio, estudios *in vitro* usando cultivos de adipocitos 3T3-L1 (Rotter et al., 2003) y en ratones (Kim et al., 2004) muestran que la IL-6 a altas dosis puede inducir resistencia a la insulina. Mientras que un estudio con cultivos de células musculares no muestra efecto de la IL-6 en la acción de la insulina (Weigert et al., 2004), ratones deficientes para la IL-6 desarrollan resistencia a la insulina (Matthews et al., 2010) y muestran la tolerancia a la glucosa alterada que puede revertirse con la administración de IL-6 (Wallenius et al., 2002b).

La IL-6 también contribuye a la producción de glucosa hepática durante el ejercicio (Keller et al., 2001). Los mecanismos que median el control de la producción y liberación de glucosa durante el trabajo muscular aún no se conocen. La administración aguda de IL-6 recombinante humana a concentraciones fisiológicas en humanos en reposo no tiene efecto en el gasto de glucosa en todo el organismo ni en la captación de glucosa ni en la producción de glucosa endógena (Petersen et al., 2005; Steensberg et al., 2003b). Por el contrario, la IL-6 contribuye al incremento en la producción de glucosa endógena durante el ejercicio físico (Febbraio et al., 2004) (fig 1.10). Cuando se administra IL-6 recombinante humana a voluntarios sanos durante un ejercicio de baja intensidad, con la intención de mimetizar la concentración de IL-6 observada durante un ejercicio de alta intensidad, la producción de glucosa que se da es tan alta como durante la realización de un ejercicio de alta intensidad, de lo que se concluye que la IL-6 parece tener un papel en la producción endógena de glucosa durante el ejercicio (Febbraio et al., 2004). Su acción en el hígado parece ser

Introducción

dependiente de un factor inducido por la contracción muscular que aún no se ha identificado (Pedersen and Febbraio, 2012).

La IL-6 incrementa la captación basal de glucosa y la expresión del transportador de glucosa GLUT4. Estudios *in vitro* demuestran que los efectos de la IL-6 en la captación de glucosa estarían mediados por la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Carey et al., 2006). Varios trabajos han mostrado que el incremento de la oxidación de ácidos grasos intramiocelular o en todo el cuerpo podría darse también a través de la AMPK (Al-Khalili et al., 2006; Carey et al., 2006; Kahn et al., 2005). La IL-6 de manera aguda media la señalización y exhibe acciones parecidas a las de la leptina, como la activación de AMPK y la señalización de la insulina (fig 1.10).

La AMPK se activa al ser fosforilada por la AMPK quinasa (AMPKK) y por activación alostérica cuando aumentan los niveles de AMP (Woods et al., 2000), actuando así como un sensor que promueve el catabolismo y la regeneración de ATP. La activación de la AMPK fosforila la acetil CoA carboxilasa (ACC), que tiene una función importante en la conversión del acetilCoA en malonil CoA. Esta fosforilación inhibe la actividad de la ACC, lo que provocará la disminución de los niveles de malonil CoA que está inhibiendo la transferasa palmitoil carnitina 1 (CPT-1), una enzima limitante de la entrada de acil CoA de cadena larga a la mitocondria para su oxidación. La desinhibición de la CPT1 aumentará la oxidación de ácidos grasos. Se cree que ésta es la vía por la que la AMPK lleva a cabo sus efectos en la reducción de lípidos almacenados en el músculo y el hígado y por lo tanto sus efectos sensibilizantes a la insulina (Kahn et al., 2005; Merrill et al., 1997). La IL-6 tiene efectos directos en la lipólisis y en la oxidación de ácidos grasos (fig 1.10), por lo que podemos considerar a la IL-6 como un factor lipolítico. De esta manera, la infusión de IL-6 recombinante

humana en individuos sanos causa un incremento en la lipólisis en ausencia de hipertrigliceridemia o de cambios en las catecolaminas, el glucagón, la insulina o de algún efecto adverso (Petersen et al., 2005; van Hall et al., 2003). Por otro lado, hay trabajos que muestran que la inyección de IL-6 a niveles fisiológicos en voluntarios humanos estimula la lipólisis en el músculo esquelético, sin que se vea afectada en el tejido adiposo (Wolsk et al., 2010).

Se ha demostrado que la actividad física induce un incremento de los niveles sistémicos de varias citoquinas con propiedades antiinflamatorias (Petersen and Pedersen, 2005). Los efectos protectores del ejercicio en las enfermedades cardiovasculares, la diabetes tipo 2 y el cáncer están bien establecidos y existe la posibilidad de que la actividad antiinflamatoria inducida por la práctica regular de ejercicio pueda ejercer efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades crónicas. La IL-6 probablemente media alguno de los efectos antiinflamatorios y inmunoreguladores del ejercicio (Nielsen and Pedersen, 2008). Esta citoquina inhibe la producción de TNF α inducida por LPS en cultivos de monocitos humanos (Schindler et al., 1990), mientras que la supresión de IL-6 en ratones, ya sea usando anticuerpos monoclonales anti IL-6 o en ratones deficientes en esta citoquina, aumenta en el plasma los niveles de TNF α en respuesta al LPS (Di Santo et al., 1997; Fattori et al., 1994; Starnes et al., 1990), lo que sugiere que la IL-6 circulante está implicada en la regulación de los niveles de TNF α . De este modo, tanto la infusión de IL-6 recombinante humana como el ejercicio inhiben el incremento en los niveles circulantes de TNF α inducidos por endotoxina en individuos sanos (Starkie et al., 2003). El incremento de IL-6 tras el ejercicio va seguido por la aparición del antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra) y de la IL-10, que son citoquinas antiinflamatorias (Steensberg et al., 2003a). En la mayoría de estudios sobre el ejercicio la expresión de TNF α no cambia, sólo el ejercicio prolongado y muy intenso,

Introducción

como por ejemplo correr un maratón, resulta en un pequeño incremento de la concentración plasmática de esta citoquina (Starkie et al., 2001b; Suzuki et al., 2000; Toft et al., 2000). La respuesta de las citoquinas al ejercicio no está precedida de un incremento en plasma de TNF α . El hecho de que las citoquinas proinflamatorias clásicas, TNF α y IL-1 β , en general, no aumenten con el ejercicio indica que la cascada de citoquinas inducida por el ejercicio es diferente de la cascada de citoquinas inducida por las infecciones (fig 1.7) (Pedersen and Febbraio, 2008).

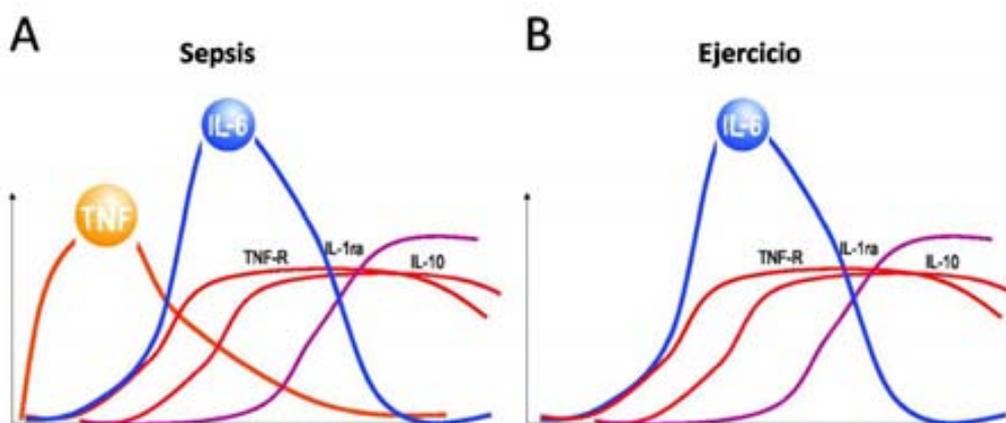


Fig 1.7: Comparación del incremento de citoquinas circulantes inducidas en una situación de sepsis (A) y durante el ejercicio (B). Mientras que en la sepsis se observa un rápido aumento de TNF α seguido del aumento de IL-6, en la situación de ejercicio el incremento de IL-6 no va precedido de un aumento de TNF α . Figura extraída de Pedersen and Febbraio, 2008.

1.4. El tejido adiposo y las adipoquinas

El tejido adiposo está presente en todas las especies de mamíferos. Hay dos tipos de tejido adiposo que pueden diferenciarse funcional y histológicamente, el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo marrón (BAT) y sus adipocitos exhiben importantes diferencias.

Recientemente, se ha descubierto un nuevo tipo de adipocito al que se la ha

llamado adipocito beige. Este adipocito se ha encontrado en el WAT y son células que exhiben las características funcionales del adipocito marrón clásico, sin embargo, son molecularmente distintas y con un desarrollo diferente del adipocito marrón. Se encuentran como precursores y con una estimulación apropiada, como con agonistas de *receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ)*, se diferenciarán en células que poseen la maquinaria funcional necesaria para la termogénesis pero que no expresan marcadores específicos de la grasa marrón (como por ejemplo *Zic1*, *Lhx8*, *Meox2*, y *PRDM16*) (Petrovic et al., 2010).

Los adipocitos, ya sean marrón, blanco o beige, son la principal célula del tejido adiposo (Hausman et al., 2001; Trayhurn et al., 2011), pero también hay otros tipos de células adicionales que incluyen células endoteliales, fibroblastos, pericitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y preadipocitos (Harwood, 2012; Trayhurn et al., 2011). Este conjunto de células se llaman “células del estroma vascular”, son un porcentaje importante del número total de células que forman el tejido y ejercen importantes funciones para la homeostasis del tejido adiposo. De esta manera, la células endoteliales y pericitos forman la vasculatura del tejido y son capaces de controlar procesos como el crecimiento y el desarrollo del tejido adiposo (Brakenhielm et al., 2004; Rupnick et al., 2002); los monocitos y los macrófagos presentes en el tejido adiposo se cree que ayudan a la eliminación de los adipocitos necróticos, función aún más importante en la obesidad (Cinti et al., 2005). Los macrófagos también son responsables del incremento de la producción de citoquinas inflamatorias en la obesidad (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003).

1.4.1. Tejido adiposo marrón (BAT)

El adipocito marrón característico del BAT contiene muchas gotas lipídicas de varios tamaños en el citoplasma, un citoplasma relativamente abundante, un núcleo

Introducción

esférico ligeramente excéntrico y muchas mitocondrias que liberan calor vía oxidación de ácidos grasos (Cannon and Nedergaard, 2004) (fig 1.8). Los adipocitos marrones son más pequeños que los adipocitos del WAT, y su función principal es la termogénesis (Trujillo and Scherer, 2006). La expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1) y el gran número de mitocondrias en el adipocito marrón son dos características distintivas del BAT.

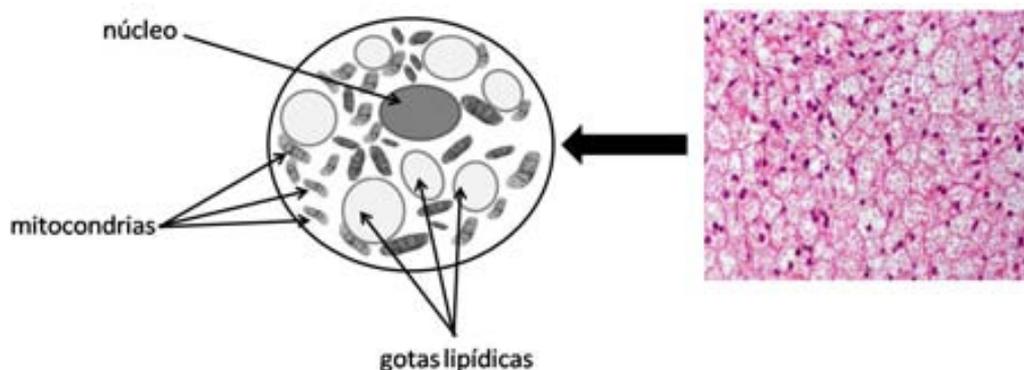


Fig 1.8: Adipocito marrón y BAT. Esquema de un adipocito marrón e imagen de una sección histológica de tejido adiposo marrón teñida con hematoxilina eosina

Este tejido está especializado en la producción de calor, que ocurre a través de la acción de la UCP1 localizada en la membrana mitocondrial interna y que actúa como un canal de protones, descargando el potencial generado por la acumulación de estos en el espacio mitocondrial intermembrana, desviándolos de la ATP sintasa y permitiendo que el potencial de energía se disipe en forma de calor (Cannon and Nedergaard, 2004). La alta concentración de citocromo oxidasa en las mitocondrias de los adipocitos marrones contribuye al color oscuro. Aunque el BAT tiene un papel relevante en roedores adultos, en el caso de los humanos, originalmente se creía que el BAT, que está presente en los fetos y en los recién nacidos, estaba ausente en los adultos. Ahora se sabe que existen sustanciales cantidades de adipocitos marrones a lo largo de la vida en el tejido adiposo humano (Krief et al., 1993; Nedergaard et al.,

2007).

1.4.2. Tejido adiposo blanco (WAT)

El WAT es el tejido adiposo predominante en los mamíferos. Está compuesto principalmente por adipocitos rodeados de tejido conectivo que está altamente vascularizado e innervado y que contiene otros tipos de células (Harwood, 2012).

El adipocito del WAT almacena triglicéridos en la única gran gota de lípidos que contienen y que comprende el 85-90% de la masa de la célula (Fonseca-Alaniz et al., 2007; Harwood, 2012; Henry et al., 2012) (fig 1.9), por lo que esta célula tiene una gran capacidad para el almacenamiento de lípidos (Henry et al., 2012). El adipocito blanco maduro a menudo es una célula más grande que las células inmunes, los hepatocitos o las células del músculo esquelético y su tamaño cambia drásticamente dependiendo de la cantidad de triglicéridos que acumulan (Fonseca-Alaniz et al., 2007).

Los adipocitos maduros constituyen alrededor del 50% del total de las células del tejido. Aunque esto puede variar de acuerdo con los depósitos de grasa y con factores como el estado nutricional y el sexo.

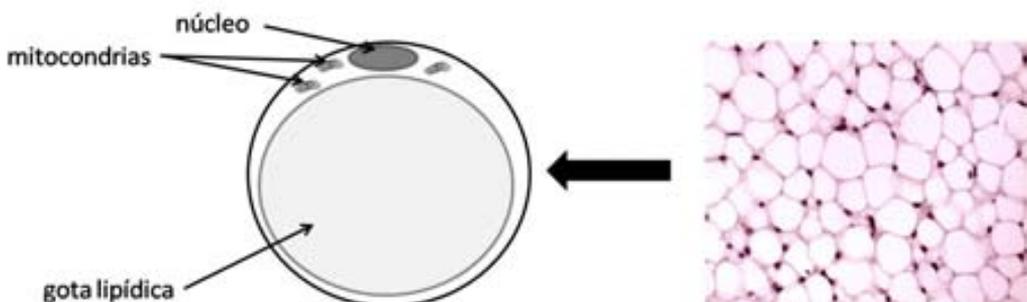


Fig 1.9: Adipocito blanco y WAT. Esquema de un adipocito blanco e imagen de una sección histológica de tejido adiposo blanco teñida con hematoxilina eosina

Introducción

El WAT está distribuido en diferentes depósitos a lo largo del cuerpo que están clasificados anatómicamente como tejido adiposo subcutáneo y tejido adiposo visceral. El tejido adiposo subcutáneo está situado formando depósitos debajo de la piel en el abdomen, los glúteos y las áreas femorales, mientras que el tejido adiposo visceral incluye los depósitos de grasa que están cerca o en las vísceras de la cavidad abdominal (Fonseca-Alaniz et al., 2007). Ejemplos de tejido adiposo visceral son la grasa mesentérica, la omental y la retroperitoneal. Varios estudios muestran diferencias en la expresión génica durante el desarrollo entre los diferentes depósitos de grasa (Gesta et al., 2006; Tchkonja et al., 2006). Además los depósitos de tejido adiposo subcutáneo y el visceral difieren en el tamaño de las células, la actividad metabólica y el rol potencial de desarrollar resistencia a la insulina en adultos (Shoelson et al., 2007), lo que podría contribuir a las diferencias observadas en la distribución de la grasa corporal, los tipos de obesidad y el desarrollo de desordenes metabólicos.

Otras de las diferencias observadas es que el adipocito subcutáneo libera más leptina que el adipocito que forma los depósitos de grasa omental (Gottschling-Zeller et al., 1999). También hay diferencias regionales en respuesta a la ganancia de peso, por lo que periodos cortos de sobrealimentación resultan en la hipertrofia de los adipocitos. Estas variaciones funcionales sugieren que el tejido adiposo tiene diversas contribuciones metabólicas según el tipo.

La distribución del tejido adiposo también está afectada por el sexo, que ejerce un profundo efecto en el metabolismo y en las funciones endocrinas del tejido adiposo. La mujeres tienen un porcentaje más alto de grasa corporal que los hombres y almacenan el tejido adiposo periféricamente en la región gluteo-femoral, mientras que los hombres almacenan el tejido adiposo en los depósitos viscerales y

abdominales (Vella and Kravitz, 2002). La lipólisis basal es más elevada en el tejido adiposo subcutáneo que en el visceral en ambos sexos, pero se observan diferencias en la lipólisis estimulada por catecolaminas en los depósitos viscerales entre hombres y mujeres (Fried et al., 1993). Las diferencias en el metabolismo de los adipocitos viscerales entre sexos desaparecen en la menopausia y esta podría ser la causa de la ganancia de peso en la región abdominal en las mujeres postmenopáusicas. Estos hallazgos sugieren que las hormonas sexuales femeninas juegan un papel en las diferencias entre los diferentes depósitos (Trujillo and Scherer, 2006).

El WAT es un excelente aislador térmico y juega un papel importante en la conservación de la temperatura corporal. Su termogénesis no parece muy importante, aunque descubrimientos recientes han demostrado la presencia de adipocitos beige con características funcionales que le permitirían tener un papel en la termogénesis (Cinti, 2009; Petrovic et al., 2010). Su distribución generalizada por todo el cuerpo, rodeando e infiltrando la región subcutánea, los órganos viscerales y una variedad de grupos de músculos permite ofrecer protección mecánica a estos, suavizando los impactos y permitiendo a las fibras musculares deslizarse unas con otras sin comprometer la integridad de sus funciones (Fonseca-Alaniz et al., 2007). Además, tiene una gran capacidad de almacenar triglicéridos que resulta vital para la supervivencia. El aumento concomitante de la insulina, la glucosa y los lípidos durante las comidas estimula la formación de triglicéridos y el almacenamiento en el hígado y el WAT. Por el contrario, la disminución de la insulina durante el ayuno estimula la glucogenólisis en el hígado y el músculo esquelético y la lipólisis en el WAT y en el hígado a través de la activación del sistema nervioso simpático y la elevación del glucagón, la adrenalina y los glucocorticoides. Durante el ayuno el tejido adiposo libera ácidos grasos que resultan parcialmente oxidados por el músculo esquelético y el hígado que generan cuerpos cetónicos que sirven como fuente alternativa de

Introducción

energía para el cerebro y órganos periféricos (Harwood, 2012).

Los adipocitos secretan grandes cantidades de ácidos grasos, principalmente palmitato y oleato, lo que refleja el rol central del tejido adiposo como el principal sitio de almacenamiento de combustible. Los ácidos grasos se depositan como triglicéridos de manera posprandial y en otros periodos de balance energético positivo, y posteriormente son liberados durante el ayuno y largos periodos de privación de energía. Sin embargo, los ácidos grasos no son la única fracción lipídica almacenada por los adipocitos ya que también almacenan colesterol (Yu et al., 2010).

También liberan la enzima lipoproteína lipasa (LPL), cuya función es la de hidrolizar triacilgliceroles circulantes con la posterior captación y reesterificación de los ácidos grasos liberados. Otras células comparten esta propiedad, especialmente los miocitos en el músculo esquelético y en el corazón.

Los adipocitos blancos liberan una gran variedad de lípidos y proteínas y también lactato. Aunque se ha puesto más énfasis en la secreción de proteínas y lípidos específicos, los adipocitos secretan grandes cantidades de lactato como resultado de la glicólisis (DiGirolamo et al., 1992; Jansson et al., 1994; Kashiwagi et al., 1983). De hecho, los adipocitos son una de las principales fuentes de lactato del organismo en todo el cuerpo, y esto sucede especialmente bajo condiciones de hipoxia, como ocurre en el tejido adiposo en la obesidad (Perez de Heredia et al., 2010).

1.4.3. Adipoquinas

Además de las funciones mencionadas, el WAT también libera factores endocrinos y paracrinicos que se conocen comúnmente como adipoquinas. Estas adipoquinas, con acciones centrales en el control de la dinámica del metabolismo energético, comunican el estatus de las reservas del organismo a los tejidos

responsables del control de la homeostasis energética (el hígado, el músculo esquelético, hipotálamo y en los adipocitos vecinos y otras células que están en el tejido adiposo) (Galic et al., 2010).

En general, los niveles en plasma de las adipoquinas aumentan con relación al incremento en la masa del tejido adiposo y del volumen de los adipocitos con excepción de la adiponectina, cuyos niveles en plasma disminuyen en la obesidad (Skurk et al., 2007; Wannamethee et al., 2007).

El TNF α , es la primera citoquina que se encontró que era secretada por los adipocitos y está relacionada con el desarrollo de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo (Hotamisligil et al., 1995; Hotamisligil et al., 1993). Posteriormente, en 1994, se descubrió que los adipocitos son el principal sitio de expresión de la leptina (Zhang et al., 1994). Tras estos descubrimientos se reconoció que el tejido adiposo como uno de los principales órganos endocrinos.

Una amplia variedad de adipoquinas han sido identificadas: entre ellas, citoquinas clásicas como el TNF α , la IL-1 β y la IL-6; quimioquinas como la proteína quimioatrayente de monocitos -1 (MCP-1); implicadas en el manejo de lípidos como la proteína transportadora de ésteres de colesterol y la proteína lipasa; implicadas en el balance de la energía y del apetito, especialmente la leptina; en la hemostasis vascular, como el inhibidor del activador del plasminógeno 1; en el control de la presión sanguínea como el angiotensinógeno; en la angiogénesis, particularmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y otros factores específicos de crecimiento como el factor de crecimiento neurotrófico (NGF) (Trayhurn et al., 2011).

Algunas adipoquinas son muy relevantes, como la leptina y la adiponectina. Al principio se creyó que eran sintetizadas exclusivamente por el tejido adiposo. Sin

Introducción

embargo ahora se sabe que pueden ser producidas por otros tipos celulares, especialmente en el caso de la leptina (Berner et al., 2004; Delaigle et al., 2004; Hoggard et al., 1997; Mix et al., 2000; Smith-Kirwin et al., 1998). No obstante, los adipocitos son la principal fuente de producción de estas dos hormonas. La leptina actúa principalmente en el cerebro donde mantiene el peso corporal suprimiendo la ingesta e incrementando el gasto energético (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995) vía cambios en varios circuitos hipotalámicos (Rahmouni et al., 2009; Tang-Christensen et al., 1999). Las concentraciones circulantes de leptina correlacionan con la masa grasa (Maffei et al., 1995). Los humanos y ratones que no producen leptina desarrollan obesidad e hiperfagia que puede ser revertida con la administración de leptina (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Mistry et al., 1997; Weigle et al., 1995). Por el contrario, en una situación prolongada de hiperleptinemia alguna de las vías neuronales que controlan el apetito desarrollan resistencia a la leptina, por lo que el apetito permanece inapropiadamente alto (Henry et al., 2012; Maffei et al., 1995).

La adiponectina tiene un rol antiinflamatorio y protege contra la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2, la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la aterosclerosis. Actúa centralmente para promover la pérdida de peso y periféricamente para potenciar la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa en el músculo y disminuir la gluconeogénesis en el hígado (Henry et al., 2012).

Otras adipoquinas están implicadas en la regulación de la homeostasis de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina como la visfatina, la apelina y la proteína de unión al retinol 4 (Boucher et al., 2005; Hug and Lodish, 2005; Krook, 2008; Yang et al., 2005).

Algunas adipoquinas están relacionadas con la inflamación y la respuesta inmune,

este es el caso del TNF α , la IL-1 β , la IL-6 y la MCP1 (Trayhurn et al., 2011). El hecho que los adipocitos secreten factores relacionados con la inflamación sugiere que el tejido adiposo exhibe una respuesta inflamatoria proporcional a la expansión del tejido (Hotamisligil, 2006).

Las adipoquinas pueden actuar localmente en el tejido adiposo de manera autocrina o paracrina o a más distancia como factor endocrino en otros órganos. Un ejemplo de acción paracrina es la comunicación entre los adipocitos y los macrófagos a través de la MCP-1 y el TNF α como parte de la respuesta inflamatoria. En cambio, la inhibición de la ingesta por la leptina a través de interacciones con neuronas específicas del hipotálamo sería un ejemplo de acción endocrina. Otro ejemplo es la relación entre el tejido adiposo y el músculo esquelético. De esta manera, las adipoquinas tienen efectos tanto centrales como periféricos en órganos como el músculo esquelético, el hígado, el páncreas, la vasculatura y el cerebro e influyen en diversos procesos metabólicos, como el metabolismo de los carbohidratos, el metabolismo de los lípidos, la inflamación, la coagulación de la sangre, la presión sanguínea, el gasto energético y el comportamiento alimentario (Harwood, 2012). La desregulación de la secreción y de la acción de las adipoquinas que ocurre en el tejido adiposo en expansión en la obesidad juega un papel fundamental en el desarrollo de desórdenes cardiometabólicos como el síndrome metabólico, la diabetes tipo 2, desórdenes inflamatorios y desórdenes vasculares.

A diferencia de otras adipoquinas, las citoquinas inflamatorias secretadas desde el tejido adiposo no son sólo producidas por los adipocitos, sino que las células del estroma vascular y especialmente los macrófagos residentes, son también responsables de la respuesta inflamatoria crónica observada en la obesidad (Weisberg et al., 2003). Estos macrófagos presentan un fenotipo diferente dependiendo de si

Introducción

están en un tejido adiposo delgado o cargado de grasa. Por ejemplo, los macrófagos residentes en el tejido adiposo delgado se caracterizan por un incremento en la expresión de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10, muestran una capacidad incrementada de reparar el tejido y de angiogénesis y se conocen comúnmente como M2 o macrófagos activados alternativamente (Lumeng et al., 2007). Sin embargo, la expansión del tejido adiposo en la obesidad está asociado con un incremento de la infiltración de macrófagos circulantes de fenotipo M1 o clásicamente activados (Coenen et al., 2007). Estos macrófagos típicamente se reclutan en tejidos dañados por lo que presentan un incremento de la expresión de citoquinas proinflamatorias, como el TNF α y la IL-6.

1.4.3.1. La IL-6: una adipocina que responde a los cambios de masa corporal

Aproximadamente el 30% de la IL-6 detectada en el plasma en situaciones no inflamatorias se atribuye a la producción en el WAT, con una mayor producción en el tejido adiposo visceral que en el subcutáneo (Mohamed-Ali et al., 1997). Sin embargo, la mayoría de la IL-6 derivada del tejido adiposo es producida por la fracción de células del estroma vascular (Fain et al., 2004) y ejerce efectos paracrinós en los adipocitos. En el tejido adiposo humano en cultivo, la IL-6 incrementa la secreción de leptina y reduce la de adiponectina, incrementa la lipólisis y disminuye la actividad LPL (Trujillo et al., 2004) (fig 1.10) e *in vivo* la administración de IL-6 recombinante humana en sujetos sanos incrementa la oxidación de grasa en todo el cuerpo y produce un aumento de la concentración de ácidos grasos y triglicéridos circulantes. Esto indicaría que la IL-6 podría ser un modulador del metabolismo lipídico sin causar hipertrigliceridemia (van Hall et al., 2003).

Los niveles plasmáticos de IL-6 se ven afectados por cambios en la

acumulación de grasa y correlacionan positivamente con los niveles plasmáticos de FFA y con la masa corporal. De esta forma, aumentan en la obesidad y en la diabetes tipo 2 y por el contrario, la pérdida de peso reduce significativamente los niveles de IL-6 en el suero y en el tejido adiposo (Bastard et al., 2000). Todos estos datos sugieren que el incremento en la producción de IL-6 en el tejido adiposo podría contribuir a daños metabólicos y endocrinos asociados a la obesidad. Aunque por otro lado, ratones deficientes en IL-6 desarrollan obesidad con la edad (Wallenius et al., 2002b), y en ratas la administración intracerebroventricular (icv) aguda de IL-6 causa un incremento del gasto energético (Wallenius et al., 2002a), de lo que se puede deducir que la IL-6 podría tener un papel protector contra la obesidad. Aunque estos hallazgos están en entredicho por otros autores que no han confirmado que ratones deficientes en IL-6 desarrollen obesidad con la edad (Di Gregorio et al., 2004). Con todos estos datos el papel de la IL-6 en los cambios metabólicos y endocrinos asociados con la obesidad no está claro.

1.4.3.1.1. La IL-6 y la obesidad

La incidencia de la obesidad en el transcurso de las últimas décadas ha ido aumentando hasta convertirse en un importante problema epidemiológico de la sociedad actual. Datos actuales* indican que el sobrepeso y la obesidad son el quinto factor de riesgo de defunción en el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que más de 1400 millones de adultos de más de 20 años tienen sobrepeso, de los cuales más de 200 millones de hombres y más de 300 millones de mujeres son obesos. Este incremento no sólo se ha observado en la población adulta; en 2010, más de 40 millones de niños menores de 5 años presentaban

* Datos recogidos de la Organización Mundial de la Salud en la nota descriptiva N° 311 de mayo de 2012

Introducción

sobrepeso. La obesidad está asociada con el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, enfermedad del hígado graso, aterosclerosis, desórdenes degenerativos como la demencia, enfermedades de las vías respiratorias y algunos cánceres (Hotamisligil, 2006).

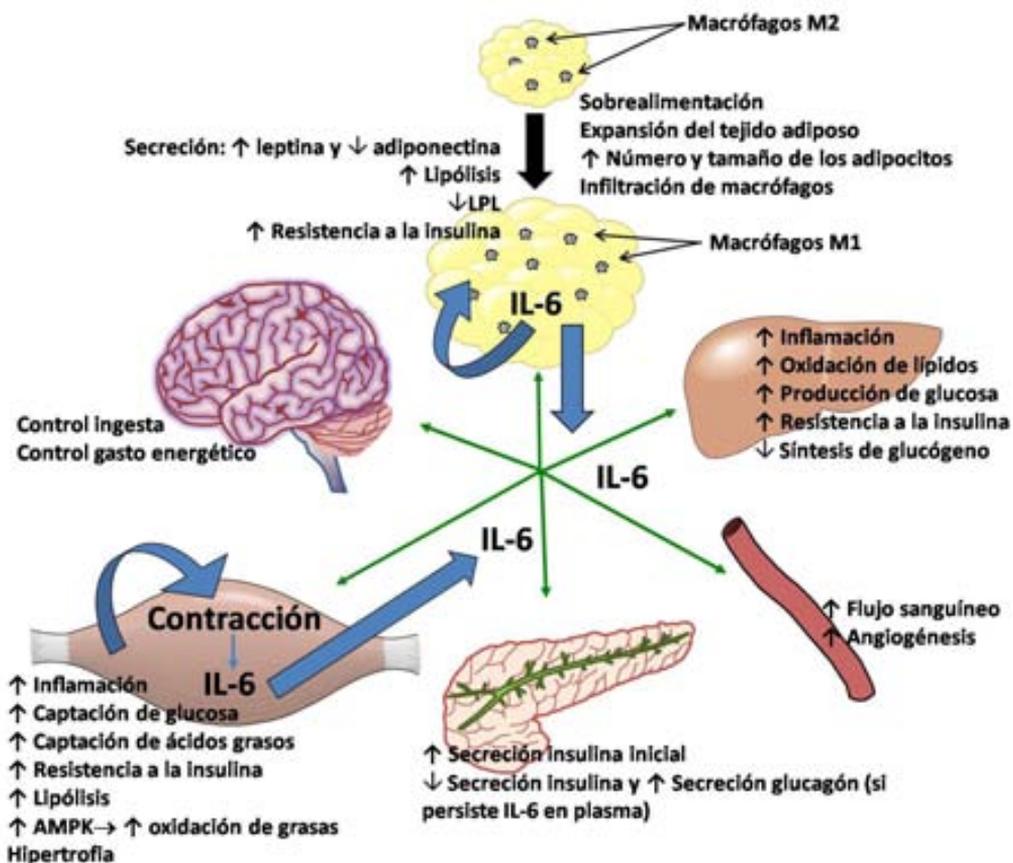


Fig 1.10: Efectos de la IL-6 en la homeostasis energética. La IL-6 producida en el músculo esquelético por la contracción muscular o en el tejido adiposo en una situación de obesidad aumenta los niveles circulantes de esta citoquina. Tiene efectos sistémicos en el hígado, el WAT y en el músculo esquelético y actúa en el páncreas, donde en un primer momento aumenta la secreción de insulina, pero si la concentración circulante de IL-6 se mantiene elevada durante largos periodos acaba produciendo el efecto opuesto. Está implicada en la lipólisis y en la secreción de otras adipoquinas en el tejido adiposo y en la oxidación de ácidos grasos mediada por AMPK, y en el aumento de la captación de glucosa inducida por insulina en el músculo. Participa en la resistencia a la insulina en diferentes tejidos. También puede tener efectos en el cerebro relacionados con el control de la ingesta y el gasto energético. Figura basada en Pedersen and Febbraio, 2012.

El incremento de la disponibilidad de alimentos, la adaptación a un estado de vida sedentario o cambios en el contenido de la dieta o en el valor nutricional pueden ser algunas de las causas del aumento de la incidencia de esta enfermedad (Saltiel, 2012).

La obesidad se relaciona con estrés mecánico, exceso de acumulación de grasas, anormalidades en los flujos de energía intracelular y en la disponibilidad de nutrientes. En los individuos obesos hay un incremento en la expresión y en la liberación de la mayoría de factores relacionados con la inflamación por los adipocitos excepto en el caso de la adiponectina, cuya expresión disminuye con la obesidad. También está asociada con un estado de inflamación leve con una progresiva infiltración de macrófagos en el tejido adiposo (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003) inducida por la producción de la quimioquina MCP-1 por el adipocito (Kanda et al., 2006). Las citoquinas derivadas de las células inmunes y las adipoquinas liberadas por el adipocito aumentan la inflamación del tejido adiposo y pueden acabar causando resistencia a la insulina (Harford et al., 2011; Hotamisligil et al., 1993). La primera de estas moléculas que se encontró que relacionaba la obesidad con la inflamación fue el TNF α (Hotamisligil et al., 1993). Tras varios estudios se descubrieron otros mediadores de la inflamación que jugaban un papel muy parecido al del TNF α durante la obesidad (Wellen and Hotamisligil, 2005). Entre estos uno muy importante es la IL-6.

En el tejido adiposo, los macrófagos derivados de la médula ósea establecen una correlación con la obesidad y con el tamaño de los adipocitos (Shoelson et al., 2007; Weisberg et al., 2003). Por otro lado, los macrófagos residentes en el tejido adiposo son también fuente de otras citoquinas proinflamatorias que pueden modular la actividad secretora del adipocito (Xu et al., 2003). Además no

Introducción

todos los depósitos de grasa se comportan igual, el tejido adiposo visceral produce una mayor cantidad de IL-6 que el tejido adiposo subcutáneo (Fain et al., 2004) y parece ser que está más relacionado con el desarrollo de la resistencia a la insulina que el tejido adiposo subcutáneo. Una posible explicación es que el tejido adiposo visceral, a diferencia del subcutáneo, tiene acceso directo a la circulación portal de manera que las sustancias que produce, como por ejemplo la IL-6, impactan directamente en el hígado (Shoelson et al., 2007). Así, en pacientes extremadamente obesos, el tejido adiposo visceral es el principal contribuidor a la concentración de IL-6 plasmática, sugiriendo que la elevada exposición hepática a la IL-6 puede jugar un rol en la desregulación del metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos en los desordenes cardiometabólicos (Fontana et al., 2007).

El papel de la IL-6 no deja de ser controvertido. De esta manera, cuando la IL-6 es producida por el músculo esquelético durante y después del ejercicio tiene un efecto positivo en la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético, pero por el contrario, un incremento crónico de los niveles de IL-6, como sucede en la obesidad, está asociado con el incremento de la resistencia a la insulina (Trayhurn et al., 2011). También se ha descrito que la IL-6 activa la lipólisis en el tejido adiposo y que podría jugar un rol en el suministro de energía durante el ejercicio (Pedersen and Febbraio, 2008). La aparente contradicción entre el incremento de los niveles de IL-6 durante el ejercicio y el incremento de IL-6 en la obesidad y en los pacientes diabéticos indica que esta citoquina podría tener efectos agudos y crónicos totalmente diferentes.

Una pregunta interesante es por qué el WAT libera citoquinas proinflamatorias. Una posible explicación sería la respuesta a la hipoxia en áreas

de los depósitos de grasa debida al incremento de la masa del tejido durante el desarrollo de la obesidad. El tejido adiposo se expande y llega un momento que la vasculatura es insuficiente para mantener la normoxia en todo el tejido, lo que causa que grupos de adipocitos se vuelvan hipóxicos, y esto produce una respuesta inflamatoria que sirve para incrementar el flujo sanguíneo y estimular la angiogénesis (Eder et al., 2009; Rupnick et al., 2002). La hipoxia incrementa la expresión de la subunidad α del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). La HIF-1 está formada por la subunidad HIF-1 β que está constitutivamente expresada y la subunidad HIF-1 α que se recluta en situaciones de disminución de la tensión de O_2 para producir factores de transcripción funcionales (Wang et al., 2007). La hipoxia estimula la expresión de IL-6, que resulta regulada al alza (Wang et al., 2007). Otro gen estimulado por la hipoxia es el que codifica para el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF) que juega un papel muy importante en el reclutamiento de macrófagos (Rupnick et al., 2002; Skurk et al., 2007). La hipoxia por tanto podría ser una de las causas de la respuesta inflamatoria observada en el tejido adiposo en la obesidad.

Se ha descrito que en humanos no diabéticos la acumulación de grasas correlaciona con marcadores de estrés oxidativo (Furukawa et al., 2004). La exposición de adipocitos en cultivo a especies reactivas de oxígeno (ROS) suprime la expresión del mRNA y la secreción de adiponectina, a la vez que aumenta la expresión del mRNA de IL-6, PAI-1 y MCP-1 (Furukawa et al., 2004). La producción de H_2O_2 sólo aumenta en el tejido adiposo de ratones obesos, pero no en otros tejidos como el músculo esquelético o el hígado. Cuando se acumula grasa, la NADPH oxidasa se reactiva por los ácidos grasos libres (FFAs) y contribuye a la producción de ROS (Furukawa et al., 2004). Por otro lado, en cultivos de adipocitos, la disipación de las ROS produce la disminución de la secreción de IL-6

Introducción

(Lin et al., 2005). Es posible que el aumento de la producción de ROS y de la secreción de MCP-1 desde los cúmulos de grasa cause la infiltración de macrófagos y la inflamación en el tejido adiposo de individuos obesos. Por otro lado, la hiperglucemia también puede aumentar las ROS, de esta manera, en cultivos de adipocitos expuestos a condiciones hiperglucémicas se produce un aumento de la secreción de IL-6 (Lin et al., 2005).

La obesidad es un rasgo complejo y multifactorial que no puede ser explicada únicamente por un factor. Se ha demostrado que la IL-6 es uno de los factores que contribuyen a ella y a pesar de las controversias sobre su papel, entender el rol que juega en el control de la homeostasis energética podría ayudar a desarrollar terapias de prevención de la obesidad.

1.4.3.1.2. La IL-6 y la resistencia a la insulina

La insulina realiza su acción a través de la unión a su receptor en la superficie de las células que responden a la insulina. Una vez se estimula el receptor se fosforila a él mismo y a varios sustratos como a la familia de los IRS que inicia la señalización (White, 1997). Así que la inhibición de la señalización llevará al desarrollo de la resistencia a esta hormona (Aguirre et al., 2000; Hotamisligil et al., 1996; Paz et al., 1997; Wellen and Hotamisligil, 2005). La resistencia a la insulina se caracteriza por la disminución en la acción de la insulina en órganos sensibles a sus efectos, como el hígado, el músculo, el tejido adiposo y el endotelio (Eder et al., 2009).

En situaciones de sobrealimentación crónica u otros estados de estrés celular puede desarrollarse resistencia a la insulina. Numerosos estudios han identificado una fuerte correlación entre la obesidad y la resistencia a la insulina

y esta relación es parecida a la que hay entre la resistencia a la insulina y la diabetes (Ludvik et al., 1995; Rabinowitz and Zierler, 1962; Saltiel, 2012). Estas situaciones se asocian frecuentemente con hipertensión, hiperlipidemia y aterosclerosis, lo que comúnmente se conoce como síndrome metabólico.

Tanto en la obesidad como en la resistencia a la insulina es característico el aumento de citoquinas inflamatorias, especialmente la IL-6. Estudios *in vitro* con líneas celulares muestran que la IL-6 tendría un papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina en los adipocitos (Lagathu et al., 2003; Rotter et al., 2003). Por el contrario la administración de IL-6 a concentraciones fisiológicas aumenta la captación de glucosa en el tejido adiposo subcutáneo en humanos (Lyngso et al., 2002) por lo que no queda claro el papel de la IL-6 en la inducción de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo.

Resulta interesante que la expresión de SOCS3 aumenta en líneas celulares de adipocitos expuestas a IL-6 *in vitro* (Lagathu et al., 2003) y en individuos obesos resistentes a la insulina no diabéticos (Rieusset et al., 2004). Éste podría ser uno de los mecanismos por los que la IL-6 podría causar resistencia a la insulina en los adipocitos, el aumento de SOCS3 produciría la inhibición de la transducción de señales inducida por el receptor de la insulina (IR) (Rotter et al., 2003).

1.5. La IL-6 en el sistema nervioso central (SNC)

Poco después del descubrimiento de la IL-6 se demostró que algunas líneas de astrocitoma y de glioma expresan esta citoquina cuando son estimuladas por IL-1 β (Yasukawa et al., 1987). En 1996 se sugirió que la IL-6 podría actuar como un factor neurotrófico (Wagner, 1996). Desde entonces, se ha descubierto que un amplio rango

Introducción

de estímulos (desde neurotransmisores hasta citoquinas inflamatorias) son capaces de inducir la producción de IL-6 en el cerebro (Ali et al., 2000; Aloisi et al., 1992; Lee et al., 1993; Ringheim et al., 1995; Sallmann et al., 2000) y que tanto células neuronales como gliales y oligodendrocitos expresan IL-6 e IL-6R (Cannella and Raine, 2004; Gadiant and Otten, 1996). Las neuronas, las células gliales y endoteliales secretan grandes cantidades de IL-6 que puede actuar de forma paracrina en las células de alrededor o de forma autocrina regulando la expresión de proteínas de adhesión y de la misma IL-6, especialmente en presencia del sIL-6R (Jirik et al., 1989; Modur et al., 1997). Todos estos datos muestran que la IL-6 juega un importante papel en el SNC.

1.5.1. La IL-6 en la neuroinflamación

La IL-6 como citoquina prototípica tiene un rol clave en la neuroinflamación (fig 1.11). Este término se refiere al proceso que se da en el cerebro y que comprende la activación de células inmunes residentes en él: la microglía y los astrocitos. En este contexto se producen varias citoquinas y quimioquinas, ROS y otros mediadores inflamatorios como prostaglandinas y proteínas de fase aguda. Finalmente, en este proceso la barrera hematoencefálica (BHE) se acaba rompiendo y se produce la infiltración de células inmunes de la periferia (Spooren et al., 2011).

Durante la neuroinflamación se da la astrogliosis y la microgliosis (fig 1.11). La astrogliosis (también llamada astrocitosis) se caracteriza por una hipertrofia y una hiperplasia de los astrocitos. Hay una regulación al alza de la proteína ácida glial (GFAP), que es uno de los principales marcadores de astrocitos, y de la vimentina, ambas proteínas citoesqueléticas. La astrogliosis sería un proceso beneficioso que permitiría la restricción de las infecciones y la infiltración de células inflamatorias; ayudaría a mantener la integridad de la BHE y la protección neuronal y la regeneración. En este contexto estudios con ratones transgénicos que expresan la IL-6

en astrocitos bajo el promotor de la GFAP (GFAP-IL-6) o en neuronas bajo el promotor de la enolasa específica neuronal (NSE-IL-6) muestran una prominente astrogliosis (Campbell et al., 1993; Di Santo et al., 1996; Heyser et al., 1997; Tilgner et al., 2001). La administración icv de IL-6 aumenta la expresión de GFAP y la astrogliosis (Balasingam et al., 1994; Woiciechowsky et al., 2004). En línea con estos resultados, trabajos con ratones deficientes para IL-6 muestran una disminución de la astrogliosis después de la lesión (Klein et al., 1997), por lo que la IL-6 parece tener un papel promoviendo la proliferación de los astrocitos (Guillemin et al., 1996; Selmaj et al., 1990), incrementando la producción de mediadores inflamatorios (prostaglandinas, citoquinas, quimioquinas y proteínas de fase aguda) en los astrocitos (Barnum et al., 1996; Bolin et al., 2005; Kordula et al., 1998; Quintana et al., 2008) e iniciando la quimiotaxis de estas células regulando al alza la expresión del receptor de quimioquinas CXCR4 (Odemis et al., 2002). La IL-6 también está implicada en la microgliosis. Así, ratones transgénicos GFAP-IL6 y NSE-IL-6 muestran un aumento de la microgliosis (Campbell et al., 1993; Di Santo et al., 1996; Heyser et al., 1997; Tilgner et al., 2001). En relación con esto, en ratas la administración icv de anticuerpo anti-IL-6 bloquea la microgliosis inducida por LPS (Pang et al., 2006) y ratones deficientes en IL-6 presentan una disminución del estado de activación temprana y media de la microglía después de la lesión del nervio facial, mientras que los estados más tardíos no se ven afectados (Galiano et al., 2001). También se ha sugerido que en condiciones neuroinflamatorias la IL-6 tendría funciones antiinflamatorias y ayudaría a mantener la integridad de la BHE (Milner and Campbell, 2006; Oh et al., 1998; Shrikant et al., 1995).

1.5.2. La IL-6 como factor neurotrófico

La IL-6 también se considera un factor neurotrófico por el papel que realiza en la homeostasis y el desarrollo del SNC. Estudios *in vitro* muestran que las células PC12

Introducción

tratadas con IL-6 se diferencian desarrollando neuritas y aumentando el número de canales de sodio dependientes de voltaje (Sato et al., 1988). La IL-6 también estimula la diferenciación de las neuronas de la raíz del ganglio dorsal (Cao et al., 2006; Hirota et al., 1996; Zhang et al., 2007), neuronas hipocampales (Cao et al., 2006) y células de Schwann (Zhang et al., 2007). Además promueve la supervivencia en varios subtipos de cultivos neuronales primarios (Marz et al., 1998; Murphy et al., 2000; Schafer et al., 1999; Thier et al., 1999; Valerio et al., 2002; von Coelln et al., 1995), pero depende de la presencia de IL-6R y sIL-6R (Marz et al., 1998; Schafer et al., 1999; Thier et al., 1999; Valerio et al., 2002), del estado de desarrollo (Horton et al., 1998), de la presencia de otros factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y de la concentración de IL-6 (Jarskog et al., 1997). Por otro lado, esta citoquina también influye en algunas características funcionales de las neuronas como en las propiedades eléctricas de las células de Purkinje (Nelson et al., 1999). La IL-6 influye a las células progenitoras y a las células madres neuronales (NSC) promoviendo astrogliogénesis y neurogénesis e inhibiendo su supervivencia y el crecimiento (Kang and Kang, 2008; Nakanishi et al., 2007; Vallieres et al., 2002). En relación con estos resultados, ratones deficientes en IL-6 tienen retardada la regeneración del nervio ciático lesionado (Lee et al., 2009b; Zhong et al., 1999).

Aunque la IL-6 se relaciona a menudo con la inflamación y con estados patológicos, es un factor que también contribuye decisivamente al funcionamiento normal del cerebro. De esta manera, la IL-6 tiene un papel importante en la inducción de la fiebre (Chai et al., 1996; Schobitz et al., 1995), estimula el eje hipotálamo pituitario adrenal (Girotti et al., 2012), está implicada en el comportamiento emocional (Armario et al., 1998; Butterweck et al., 2003), en el dolor (Murphy et al., 1999; Ramer et al., 1998; Zanjani et al., 2006), tiene efectos en el comportamiento del sueño y la vigilia (Morrow and Opp, 2005) y en el aprendizaje y la memoria (Balschun

et al., 2004; Heyser et al., 1997).

1.5.3. La IL-6 en el control de la homeostasis energética

Además de todas estas funciones la IL-6 también está implicada en el control del peso corporal, la ingesta y el gasto energético. La primera hormona implicada en el control del peso corporal en el SNC fue la insulina, que puede entrar en el cerebro desde la circulación (Baura et al., 1993) y actuar ahí controlando el gasto energético. Posteriormente, se descubrió la leptina (Zhang et al., 1994), una hormona secretada principalmente por los adipocitos y que al igual que la insulina actúa en el cerebro controlando la ingesta. Ambas hormonas se consideran señales de adipocidad (Schwartz et al., 2000), circulan a niveles proporcionales al contenido corporal de grasa (Bagdade et al., 1967; Considine et al., 1996) y entran al SNC en proporción a los niveles plasmáticos (Baura et al., 1993; Schwartz et al., 1996). En las neuronas implicadas en la homeostasis energética hay receptores de leptina y de insulina (Baskin et al., 1999a; Cheung et al., 1997; Obici et al., 2002). De esta manera, la administración de estos péptidos directamente en el cerebro reduce la ingesta (Air et al., 2002; Campfield et al., 1995; Weigle et al., 1995), mientras que la deficiencia de estas hormonas produce el efecto opuesto (Sipols et al., 1995; Zhang et al., 1994). Estas hormonas realizan su función regulando diferentes neuropéptidos (tabla 1.1).

Introducción

Tabla 1.1: Neuropeptidos implicados en el control de la homeostasis energética

Molécula	Regulación por señales adipocitarias
Orexigénica	
NPY	↓
AgRP	↓
MCH	↓
Hipocretina 1 y 2/orexina A y B	↓
Anorexigénica	
α -MSH	↑
CRH	↑
TRH	↑
CART	↑
IL-1 β	↑

Orexigénico se refiere a las moléculas que promueven el incremento de la ingesta y descenso del gasto energético; anorexigénico implica lo opuesto. Tabla adaptada de Schwartz et al 2000.

El núcleo arcuato (ARC) es ideal como sitio receptor de las señales de adipocidad así como para la integración de las diversas señales hormonales y neuronales, debido a que la entrada de moléculas desde la sangre tiene un acceso relativamente mayor a los receptores que en otras áreas del cerebro y esto podría ser debido en parte a la relativa permeabilidad de la BHE en el ARC (Cone et al., 2001; Peruzzo et al., 2000). En el ARC hay dos tipos de neuronas especialmente importantes: unas sintetizan el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) y la proopiomelanocortina (POMC), que en estas neuronas es procesada para obtener la hormona estimulante del melanocito α (α -MSH), la cual actúa en otras áreas del hipotálamo, en neuronas que expresan los receptores melanocortin 3 y 4 (MC3R y MC4R) para reducir la ingesta

e incrementar el gasto energético. Un segundo grupo de neuronas en el ARC producen la proteína relacionada con agouti (AgRP) y el neuropéptido Y (neuronas NPY/AgRP) que estimulan la ingesta e inhiben el gasto energético (Aponte et al., 2011; Wang et al., 1997; Xu et al., 1995). Cuando estos neuropéptidos son administrados en el cerebro crónicamente el peso corporal aumenta (Raposinho et al., 2001; Small et al., 2003) y de hecho, la insulina y la leptina actúan suprimiendo la actividad de las neuronas NPY/AgRP del ARC (Cowley et al., 2001) y activando las POMC/CART.

Las neuronas POMC/CART ejercen efectos catabólicos, de manera que cuando son más activas la ingesta se reduce y aumenta el gasto energético, por lo que si este estado se prolonga, se producirá pérdida de peso corporal. Por el contrario, las neuronas NPY/AgRP tienen efectos anabólicos, que causarán un aumento de la ingesta y descenso del gasto energético, y si sus efectos se prolongan, un incremento del peso corporal (Woods and D'Alessio, 2008). Las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP del ARC proyectan sus axones hacia dos áreas cercanas al ARC: el núcleo paraventricular (PVN) y el área hipotalámica lateral (LHA). Muchas neuronas del PVN expresan los MC3R y MC4R y varios receptores Y y sintetizan y secretan neuropéptidos que tienen acciones catabólicas éstos incluyen la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) y la oxitocina. La administración en el cerebro de estos neuropéptidos producirá una reducción de la ingesta (Benoit et al., 2000; Lokrantz et al., 1997). Por consiguiente, existe un circuito catabólico en el que el incremento de la grasa corporal está asociada con el incremento de insulina y leptina, que causarán el incremento de α -MSH y la disminución de la actividad del NPY y AgRP y en consecuencia, un incremento de la actividad de la CRH, de la TRH, de la oxitocina y de otras señales catabólicas; todo esto llevará a una reducción de la ingesta y a un incremento del gasto energético (fig 1.12).

Introducción

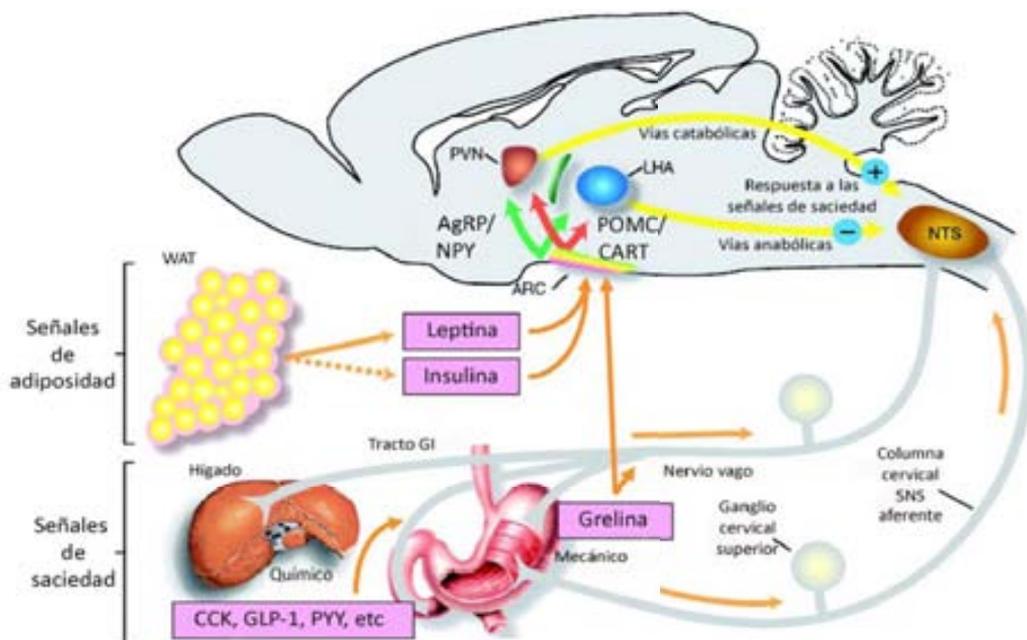


Fig 1.12: Esquema de los diferentes niveles de control de la homeostasis de la energía en el SNC. Durante las comidas en el intestino y el estómago se producen señales de saciedad que llegarán al romboencéfalo a través del sistema nervioso autónomo. Estas señales harán sinapsis con neuronas de los núcleos del tracto solitario (NTS) donde controlarán el tamaño de la comida. La grelina es producida en el estómago y puede actuar en el nervio vago y estimular neuronas del ARC directamente. Las señales relacionadas con el contenido de grasa corporal (señales de adiposidad), como la leptina (secretada por los adipocitos) y la insulina (secretada por el páncreas endocrino en proporción a la adiposidad), atraviesan la BHE e interactúan en el ARC con neuronas POMC/CART o NPY/AgRP. Las neuronas del ARC a su vez proyectan hacia otras áreas hipotalámicas como el PVN y el LHA. El PVN es catabólico y potencia las señales de saciedad en el romboencéfalo. En cambio, el LHA es anabólico y suprime la actividad de las señales de saciedad. Figura adaptada de Woods and D'Alessio, 2008.

El LHA tiene un perfil opuesto al del PVN. También recibe *inputs* del ARC, y contiene neuronas que sintetizan y secretan péptidos, entre ellos la hormona concentradora de melanina (MCH) y las orexinas. Cuando se administran estos péptidos se produce un incremento de la ingesta y del peso corporal (Della-Zuana et al., 2002; Sweet et al., 1999). La arquitectura y el funcionamiento de estos circuitos, con funciones opuestas, permiten un control rápido y preciso de la homeostasis energética, dándose un control simultáneo donde mientras un sistema es inhibido el

otro es activado (fig 1.12).

Además de la leptina y la insulina existen otras hormonas circulantes que pueden actuar en el hipotálamo, como por ejemplo la grelina (Cowley et al., 2003) que es producida en el estómago y en el duodeno y su función es estimular la ingesta (Cummings et al., 2001; Date et al., 2000). Tras la ingesta de alimentos se secretan una serie de señales llamadas señales de saciedad (tabla 1.2) que actúan durante el transcurso de la comida con la finalidad de producir el cese de ésta. La mayoría de ellas son producidas por el tracto gastrointestinal en respuesta a la digestión y ejercen su función en el romboencéfalo, donde informan al cerebro del contenido nutricional de la comida. La complejidad de las señales que recibe el cerebro está en función de la composición de macromoléculas absorbidas durante la digestión. Muchos de estos péptidos también pueden ser producidos en el cerebro. Existen numerosos circuitos neuronales que salen del área de saciedad del romboencéfalo y proyectan hacia el PVN y el LHA (fig 1.12).

Tabla 1.2: Hormonas gastrointestinales que afectan a la saciedad. Tabla adaptada de Woods and D'Alessio, 2008

Péptido	Efecto en la ingesta
Colecistoquinina (CCK)	↓
Péptido similar al glucagón tipo 1 y 2 (GLP-1 y GLP-2)	↓
Péptido tirosina-tirosina (PYY)	↓
Apolipoproteína A-IV (Apo A-IV)	↓
Enterostatina	↓
BombesiNa/péptido liberador de gastrina/neuromedina B	↓
Oxintomodulina	↓
Amilina, péptido inhibidor gástrico(GIP)	↓
Grelina	↑

Introducción

En humanos los niveles de IL-6 en el líquido cerebroespinal correlacionan negativamente con el peso corporal y los depósitos de grasa, tanto subcutáneos como totales, por lo que en algunos humanos los niveles de IL-6 del líquido cerebroespinal son mayores que los del suero (Stenlof et al., 2003). La IL-6 se transporta a través de la BHE por un sistema saturable, pero la mayoría de la citoquina que pasa por este sistema es degradada antes de alcanzar el parénquima del cerebro. Así, tras administrar en la periferia IL-6 marcada radioactivamente sólo el 16 % de ésta alcanza el parénquima, de la cual más del 50 % permanece intacta a los 30 minutos de la administración (Banks et al., 1994). Dada la excesiva degradación que sufre esta citoquina en el cerebro, la contribución de la IL-6 de la periferia en las acciones en el SNC no está clara. Se ha postulado que la IL-6 que actúa a nivel central, al menos en parte, ha de ser producida en el SNC. A pesar de esto, también existe la posibilidad que la dosis que entra sea suficiente para tener efectos biológicos (Banks et al., 1994). Por otra parte, trabajos con modelos animales muestran que ratones deficientes en IL-6 desarrollan obesidad con la edad y cuando a estos animales se les administra una pequeña dosis de IL-6 a nivel periférico (ip) durante 18 días el fenotipo es revertido sin inducir una reacción de fase aguda, a estas dosis tampoco se observan cambios en los animales *wild-type* no obesos usados como control (Wallenius et al., 2002b). Por otro lado, la expresión sostenida de IL-6 en el cerebro en ratas, ya sea por administración crónica icv de IL-6 o usando adenovirus que expresen esta citoquina, produce pérdida de peso (Li et al., 2002; Wallenius et al., 2002a). Apoyando los resultados mostrados en estos trabajos, ratones GFAP-IL-6 engordan menos que los ratones *wild-type*, especialmente cuando son alimentados con dieta grasa (Hidalgo et al., 2010), lo que sugiere que la expresión central de IL-6 es uno de los principales controladores del peso corporal.

Por otro lado, la administración aguda de IL-6 icv en el ventrículo lateral aumenta

el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono en ratas, mientras que la administración intraperitoneal no muestra efecto alguno (Wallenius et al., 2002b) lo que indicaría que la IL-6 a nivel del SNC probablemente disminuye la grasa corporal mediante el aumento del gasto energético. En ratones esto podría darse por la estimulación del sistema nervioso simpático, que induce la producción de la proteína desacoplante 1 (UCP1) e incrementa la termogénesis en el BAT (Li et al., 2002).

El efecto de la IL-6 en el control de la ingesta parece ser más inconsistente, ya que mientras unas publicaciones muestran una disminución (Wallenius et al., 2002a), otras no (Li et al., 2002). Es posible que el efecto de la IL-6 sobre la ingesta se vea a dosis más altas de las que se necesitan para ver su efecto en el gasto energético (Jansson et al., 2003). En otros modelos animales, como en los ratones GFAP-IL6, no se observan diferencias en la ingesta al compararlos con los ratones *wild-type* (Hidalgo et al., 2010), pero muestran una mayor actividad cuando realizan pruebas como el test de hole board. Todos estos datos sugieren que el papel de la IL-6 se daría principalmente en el control del gasto energético y no tanto regulando la ingesta.

Dado que el hipotálamo tiene un importante papel en el control de la ingesta y del gasto energético y que existen trabajos que muestran que neuronas del hipotálamo expresan tanto IL-6 como el IL-6R (Gao et al., 2000; Miyahara et al., 2000) lo hacen un candidato ideal para las acciones de la IL-6 en la homeostasis energética. Estudios recientes muestran la expresión del IL-6R en neuronas localizadas en las áreas hipotalámica lateral, perifornical, hipotalámica dorsal, hipotalámica posterior, en el PVN y en el núcleo supraóptico (SON) (Benrick et al., 2009; Schele et al., 2012). En humanos se ha observado que la expresión de IL-6R colocaliza en neuronas que expresan MCH. En el caso de los ratones, además de en neuronas que expresan MCH, también se ha detectado colocalización con neuronas que expresan orexina. Estos

Introducción

datos abren la posibilidad de que la IL-6 influya en el balance energético estimulando neuronas que expresan MCH en humanos y en neuronas que expresan MCH y orexina en ratones. Ratones deficientes en MCH son hipofágicos y delgados (Shimada et al., 1998), y por el contrario, ratones transgénicos que sobreexpresan MCH desarrollan obesidad (Ludwig et al., 2001). Dado el papel de este neuropéptido en el control del peso corporal, una posibilidad sería que las neuronas MCH mediaran los efectos antiobesigénicos de la IL-6. Aunque alternativamente, la IL-6 también podría participar en otras de las acciones de la MCH como el sueño, la reproducción, la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Bjursell et al., 2006; Wu et al., 2009). Otros estudios muestran que en el PVN y en el SON la expresión de IL-6R coexpresa con CRH, arginina vasopresina (AVP), oxitocina y la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), lo que sugiere que la IL-6 endógena podría estimular la producción de estos neuropéptidos y a través de ellos regular el contenido de grasa corporal (Benrick et al., 2009) aunque aún son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

Por lo que respecta a los ratones deficientes en IL-6 viejos (de más de 8 meses de edad y que presentan un aumento de peso respecto los ratones *wild-type*) muestran una disminución del mRNA de CRH, AVP y oxitocina en el hipotálamo (Benrick et al., 2009). En relación con estos datos, ratones GFAP-IL6 viejos muestran un aumento de la expresión de CRH. Los cambios en la expresión de CRH resultan interesantes en relación con el desarrollo de la obesidad. La CRH es un neuropeptido anorexigénico y catabólico, disminuye el apetito y aumenta el gasto energético y además ratones deficientes en CRH presentan un incremento de los niveles de mRNA de IL-6 en el hipotálamo (Kariagina et al., 2004). Si tenemos en cuenta que los ratones deficientes en IL-6 presentan disminuida la activación del sistema nervioso simpático (SNS), que se infiere de la disminución de la ratio cardíaca en la respuesta al estrés y de la

supresión del gasto energético inducida por la exposición al frío (Wernstedt et al., 2006), podemos plantearnos la hipótesis que la IL-6 endógena potenciaría la expresión de CRH en el PVN y consecuentemente estimularía al SNS, que a su vez, induciría el gasto energético y disminuiría el desarrollo de la obesidad en ratones sanos. El papel de la IL-6 en la regulación de neuronas que expresan CRH en el PVN también se ha visto en la inflamación inducida por LPS, donde se ha descrito que la producción endógena de IL-6 sería necesaria para mantener la estimulación de las neuronas CRH que controlan el eje hipotálamo pituitario adrenal (HPA) después de la administración de LPS (Vallieres and Rivest, 1999). Por el contrario, en el caso de los ratones GFAP-IL-6, aunque la mayor parte de su fenotipo puede ser explicado por un incremento del tono simpático, su respuesta a la exposición al frío (que es igual que la de los *wild-type* o peor, dándose incluso mortalidad en algunos animales) no apoya a la hipótesis de la alteración del SNS (Hidalgo et al., 2010).

Aún son necesarios más estudios para entender cuáles son los mecanismos por los que la IL-6 regula a nivel central la homeostasis energética y cuál es el origen de esta citoquina. En este sentido estudios con modelos de *knock-out* condicionales específicos de tejidos podrían aportar una valiosa información.

1.6. La IL-6 en el páncreas

El páncreas es un órgano rosáceo bifuncional con funciones exocrinas y endocrinas. El páncreas exocrino está organizado en acinos, cuyas células producen cboxipeptidasas, amilasa, quimotripsina, tripsina, ribonucleasas y lipasas que son enzimas de la digestión responsables de la degradación hidrolítica de los carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y ácidos grasos en el tracto digestivo. La parte endocrina se organiza en los llamados islotes de Langerhans que se encuentran diseminados por el páncreas y que están formados por cinco tipos de células, cada

Introducción

una caracterizada por la expresión de una hormona peptídica específica: glucagón en las células α , insulina en las células β , somatostatina en las células δ , polipéptido pancreático en las células PP y grelina en las células ϵ (Jorgensen et al., 2007; Wierup et al., 2002).

Los islotes de Langerhans además de hormonas peptídicas producen una variedad de citoquinas y quimioquinas en respuestas a estímulos fisiológicos y patológicos inducidos por nutrientes. Estas citoquinas parecen estar relacionadas con la adaptación y la reparación a corto plazo de las células α y β . De esta manera, en una situación de estrés metabólico crónico los islotes desarrollarán un proceso autoinflamatorio que producirá fallos en la secreción de insulina y si se mantiene puede acabar en el desarrollo de diabetes tipo 2 (Donath et al., 2010). En esta línea ratones *knock-out* condicionales para el receptor de la IL-6 en hepatocitos presentan una inflamación sistémica que produce una disminución de la función de las células β que secretan menos insulina (Wunderlich et al., 2010).

De entre las citoquinas que producen las células de los islotes pancreáticos la IL-6 tiene un papel importante. Así, en modelos en roedores de diabetes tipo 1 y de diabetes tipo 2 se ha visto que los islotes pancreáticos producen y liberan IL-6 (Campbell et al., 1991; Ehses et al., 2009; Ehses et al., 2007). Además, estudios *in vitro* en humanos y ratón muestran que los islotes responden al estrés metabólico aumentando la liberación de IL-6 (Boni-Schnetzler et al., 2009; Ehses et al., 2007). Asimismo, se ha demostrado que las células α , no sólo producen IL-6, sino que también expresan grandes cantidades de IL-6R (Ellingsgaard et al., 2008), por lo que la IL-6 podría tener efectos biológicos en estas células. Todos estos datos muestran que hay una producción de IL-6 en el páncreas que estaría aumentada en la obesidad y en la diabetes tipo 2, lo que sugiere que la IL-6 tiene un rol paracrino/autocrino en los

islotos pancreáticos bajo estas condiciones.

La IL-6 podría tener un papel en la regulación de las células α y β pancreáticas. En relación con esto, la IL-6 aumenta la proliferación e inhibe la apoptosis inducida por el aumento de glucosa y de ácidos grasos de las células α . De esta manera, ratones deficientes en IL-6 alimentados con una dieta grasa son incapaces de expandir su masa de células α , lo que apoyaría al papel de la IL-6 en la supervivencia de las células α en estas condiciones (Ellingsgaard et al., 2008). La IL-6 administrada de forma aguda regula la expresión de mRNA de proglucagón y la secreción de glucagón. Así, ratones deficientes en IL-6 alimentados con una dieta grasa muestran una disminución de los niveles de glucagón en ayuno al compararlos con los ratones *wild-type* en la misma dieta. Por otro lado, el tratamiento sostenido de islotos pancreáticos humanos y de roedores con IL-6 produce un fallo en la secreción de la insulina estimulada por glucosa (Ellingsgaard et al., 2008). Con respecto al efecto de la IL-6 en la supervivencia de las células β hay más discrepancias. Por un lado se ha demostrado que la IL-6 previene la apoptosis de líneas de células β expuestas a una mezcla de citoquinas inflamatorias (Choi et al., 2004) y por otro hay estudios que muestran que esta citoquina exacerba la apoptosis de las células β inducida por estrés metabólico en cultivos primarios de células de islotos pancreáticos de ratón (Ellingsgaard et al., 2008). Además, la sobreexpresión de IL-6 en células β *in vivo* no tiene efecto en la apoptosis de éstas ni en la inducción de diabetes (Campbell et al., 1994).

Durante la diabetes tipo 2 en los islotos de Langerhans se da una disminución de la función y de la masa de las células β y un aumento de células α proporcional a la disminución de las células β , que junto con la hiperglucagonemia inducida por el aumento de IL-6, que se da en estas condiciones, lleva a la disfunción de las células α . A pesar de esto, parece que la expansión de células α y la regulación de éstas por la IL-

Introducción

6 podrían existir como un mecanismo compensatorio de la disfunción de las células β en la obesidad y en la diabetes tipo 2, ayudando a limitar la hiperglicemia. La IL-6 sería una pieza importante en el control de la homeostasis de la glucosa.

1.7. La IL-6 en el hígado

El hígado es un órgano muy importante. Tiene un rol central en la homeostasis del metabolismo. Es responsable de metabolizar, sintetizar, almacenar y redistribuir carbohidratos, grasas y vitaminas. De esta forma, en los hepatocitos puede tener lugar la gluconeogénesis, glicogenolisis, glicogénesis, lipogénesis, y síntesis de colesterol. También produce grandes cantidades de proteínas séricas, entre ellas la albúmina, proteínas de fase aguda y factores de coagulación como el fibrinógeno. Además, es el principal órgano detoxificador del cuerpo y está implicado en la eliminación de xenobióticos por conversión metabólica y excreción biliar y en la conversión de amonio en urea (Meshkani and Adeli, 2009).

1.7.1. La IL-6 en la regeneración

Una de las funciones en las que la IL-6 juega un papel importante en el hígado es en la regeneración. El hígado tiene una gran capacidad de regenerarse después de una lesión. El proceso regenerativo implica diferentes tipos de células: hepatocitos y células no parenquimales. Este último grupo de células incluye las células de Kupffer (que son macrófagos residentes en el hígado), células endoteliales (que forman los sinusoides hepáticos) y las células esteladas (que son las células que almacenan la grasa en el hígado). Los neutrófilos y los macrófagos son las primeras células que se activan y reclutan en el hígado inflamado. Tras su activación, las células no parenquimales secretan citoquinas inmunoregulatoras y proinflamatorias como la IL-6, el $\text{TNF}\alpha$, quimioquinas, prostaglandinas y ROS.

El proceso de regeneración del hígado puede dividirse en tres fases. En condiciones normales, los hepatocitos en reposo (fase G0) reentran en el ciclo celular. Esta fase es regulada por citoquinas como la IL-6 y el TNF α . A este paso le sigue la fase de expansión donde las células se dividen hasta recuperar la masa hepática original. Esto es regulado por factores mitogénicos como el factor de crecimiento del hepatocito (HGF). En la fase final la mitosis se para. En algunas ocasiones la masa del hígado regenerada supera la original, lo que dará lugar a la apoptosis.

Los niveles de IL-6 se encuentran muy elevados después de una hepatectomía parcial (Trautwein et al., 1996). No sólo actúa como proteína de fase aguda en el hígado, sino que también es importante en la reentrada del hepatocito, que está en fase de reposo G0, al ciclo celular. Además juega un papel protector disminuyendo la muerte celular y la necrosis. Ratones deficientes en IL-6 muestran una menor síntesis de DNA, necrosis, fallo hepático y mayor ratio de mortalidad tras una hepatectomía que animales *wild-type*. Si a los ratones deficientes en IL-6 se les inyecta IL-6 antes de la hepatectomía se revierte el fenotipo, normalizando la proliferación de los hepatocitos y previniendo el daño en el hígado (Cressman et al., 1996). Otro estudio, también con ratones deficientes en IL-6 a los que se les administró una dosis de IL-6 intravenosa (acción corta) o subcutánea (acción prolongada) muestra que tras una hepatectomía parcial los ratones inyectados subcutáneamente tienen ratios de supervivencia similares a los ratones *wild-type*, mientras que los inyectados intravenosamente presentan mayor mortalidad. Este hallazgo sugiere que la duración del efecto de la IL-6 es importante para la supervivencia (Blindenbacher et al., 2003).

1.7.2. La IL-6 en la respuesta de fase aguda e inflamación

El hígado juega un papel importante en la síntesis de proteínas de fase aguda. La inflamación aguda es la primera respuesta a estímulos dañinos como las infecciones

Introducción

bacterianas. Muchas de las respuestas inflamatorias son dependientes de IL-6. Así, ratones deficientes en IL-6 presentan un dramático descenso en el hígado de la inducción de proteínas de fase aguda en respuesta a daño tisular localizado. Sin embargo, cuando la inflamación es inducida por LPS, la presencia o ausencia de IL-6 no tiene efecto en las proteínas de fase aguda hepáticas (Fattori et al., 1994; Xing et al., 1998). La IL-6 induce la producción de proteína C reactiva (CRP), que es la principal proteína de fase aguda sintetizada en el hígado después de un estímulo inflamatorio, en cultivos de hepatocitos y en células de hepatoma humano (Gauldie et al., 1987).

1.7.3. La IL-6 y el metabolismo

La IL-6 en el hígado tiene un papel importante en el control local y sistémico de la inflamación, pero además tiene un complejo efecto en el control del metabolismo en el hígado.

El control del metabolismo de la glucosa en el hígado es muy complejo. En este sentido la señalización de la insulina en el SNC inhibe la producción de glucosa hepática por mecanismos que incluyen la estimulación de la expresión de IL-6 de las células de Kupffer, que a su vez regula a la baja la expresión de G6Pasa y la salida de glucosa hepática (Inoue et al., 2006). En relación con esto, ratones que sobreexpresan crónicamente IL-6 mediante electrotransferencia en el músculo presentan una disminución de la enzima G6pasa en el hígado (Franckhauser et al., 2008). De acuerdo con estos estudios ratones *knock-out* condicionales para el receptor de IL-6 en hepatocitos, que presentan inhibida la respuesta a la IL-6, muestran un aumento tanto de la expresión del mRNA como de la proteína G6pasa en el hígado (Wunderlich et al., 2010).

La administración subcutánea de IL-6 recombinante humana a sujetos sanos

induce un incremento dependiente de dosis de los niveles de glucosa circulante debido, probablemente, al aumento de los niveles de glucagón y/o por la inducción directa o indirecta de resistencia a la insulina en tejidos periféricos (Tsigos et al., 1997). De esta manera, la administración de IL-6 induce un aumento de glucosa circulante lo que lleva a desarrollar hiperglicemia y una hiperinsulinemia compensatoria (Fasshauer and Paschke, 2003).

La IL-6 no sólo controla la gluconeogénesis sino que también regula negativamente la expresión de la glucoquinasa, lo que promueve la degradación del glucógeno. Asimismo, el tratamiento con IL-6 inhibe la síntesis de glucógeno inducida por la insulina (Senn et al., 2002), y por el contrario, la pérdida de la señalización de la IL-6 promueve la síntesis de glucógeno (Wunderlich et al., 2010). Todos estos datos sugieren que la IL-6 puede jugar un papel importante en la homeostasis de la glucosa.

La IL-6 producida en el tejido adiposo puede afectar directamente el metabolismo lipídico en el hígado, incluyendo la secreción de triglicéridos (Fasshauer and Paschke, 2003; Hong et al., 2004) y la hipertrigliceridemia. De esta forma, la activación de las vías inflamatorias puede ser el resultado de la esteatosis y/o del incremento de estrés hepático.

1.7.4. La IL-6 y la sensibilidad a la insulina

Durante la obesidad también se produce un estado de inflamación en el hígado. En este contexto, la IL-6 altera la sensibilidad a la insulina en los hepatocitos disminuyendo la señalización de la insulina. La IL-6 puede inhibir la transducción de señales del receptor de la insulina (IR) en cultivos de hepatocitos primarios de ratón y en células de hepatocarcinoma humano de la línea HepG2 y esta inhibición depende del tiempo de exposición a la IL-6 (Senn et al., 2002). En respuesta a niveles

Introducción

fisiológicos de insulina, la IL-6 disminuye la fosforilación de tirosinas del IRS-1 y disminuye la asociación de la subunidad p85 de la PI 3 quinasa con el IRS. También inhibe la activación de la Akt inducida por la insulina, que es un importante mediador de los efectos metabólicos de esta hormona. Esto sugiere que uno de los lugares de acción de la IL-6 podría ser la interacción RI/IRS-1. *In vivo*, la infusión subcutánea durante 5 días consecutivos de IL-6 humana a ratones, antes de administrar insulina también causa una disminución de la señalización del IR en el hígado. Como respuesta a los niveles de IL-6, que serían parecidos a los que se dan durante la obesidad, la fosforilación de STAT3 se incrementa en el hígado y se reduce la autofosforilación del IR hepático y de la fosforilación de las tirosinas del IRS-1 y 2 (Klover et al., 2003) por lo que estos animales presentan una disminución de la sensibilidad a la insulina (Klover et al., 2003). Estos datos sugieren que el tratamiento crónico con IL-6 disminuye en el hígado la respuesta a la insulina *in vivo*. Durante un *clamp* euglicémico hiperglicémico la expresión de IL-6, TNF α y IL-10 aumentan en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo, lo que resulta en un aumento de la IL-6 circulante y un aumento de la activación de los eventos de señalización inducidos por citoquinas como la fosforilación de STAT-3 en el hígado (Wunderlich et al., 2010). De forma parecida, el bloqueo de la acción de la IL-6 usando anticuerpos neutralizantes mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones con sobreactivación de la señalización NF κ B (Cai et al., 2005). Por el contrario, en ratones *knock-out* condicionales para el receptor de la IL-6 en hepatocitos tienen alterada la tolerancia a la glucosa y presentan resistencia a la insulina (Wunderlich et al., 2010).

A pesar de que ratones con la señalización de la IL-6 inhibida en el hígado muestran alteraciones en la fosforilación de STAT3, la fosforilación de proteína en el músculo esquelético no presenta ninguna alteración (Wunderlich et al., 2010). Esto apoya al hecho de que tras la administración de IL-6 durante 5 días a ratones, estos

animales presentan una disminución de la sensibilidad a la insulina en el hígado, pero por el contrario, no se ve efecto en la señalización de la insulina en el músculo esquelético (Klover et al., 2003). Estos datos sugieren que el tratamiento con IL-6 disminuye de forma selectiva en el hígado la respuesta a la insulina *in vivo* y cuestionan que el incremento de la IL-6 sea el responsable directo de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético.

Por otro lado, el hígado contiene gran cantidad de macrófagos residentes (células de Kupffer) que una vez activados liberan citoquinas que actúan localmente exacerbando la inflamación y la resistencia a la insulina en el hígado.

1.8. Funciones de la IL-6

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que puede realizar sus funciones de manera endocrina, paracrina o autocrina en diversos tejidos. Está implicada principalmente en la inflamación y en la respuesta a las infecciones, aunque se ha descrito que también tiene un papel importante en la regulación del metabolismo, de la regeneración y de procesos neuronales.

Durante los diferentes apartados de la introducción se ha ido hablando del papel que juega esta citoquina en diferentes órganos, por lo que a continuación se van a resumir las diferentes funciones de la IL-6.

En el sistema inmune:

- Actúa como factor de diferenciación de células B en células productoras de anticuerpos (Muraguchi et al., 1981).
- Induce la diferenciación de neutrófilos y participa en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa (Xing et al., 1998).

Introducción

- Regula la diferenciación de las células Th17 (Bettelli et al., 2006).
- Actúa como factor de crecimiento de células de mieloma y plasmacitoma (Bataille et al., 1989).

En el músculo esquelético:

- Incrementa la captación de glucosa y la expresión del transportador GLUT4 (Carey et al., 2006).
- Incrementa la oxidación de ácidos grasos (Carey et al., 2006).
- Activa la lipólisis (Al-Khalili et al., 2006).
- Aumenta los niveles de la AMPK (Al-Khalili et al., 2006; Carey et al., 2006; Kahn et al., 2005).

En el tejido adiposo:

- Incrementa la lipólisis (Trujillo et al., 2004).
- Incrementa la secreción de ácidos grasos (van Hall et al., 2003).
- Disminuye la actividad de la LPL (Trujillo et al., 2004).
- Aumenta la secreción de leptina y reduce la secreción de adiponectina (Trujillo et al., 2004).
- Incrementa la oxidación de ácidos grasos (van Hall et al., 2003).
- Induce la infiltración de macrófagos en el WAT (Weisberg et al., 2003).
- Induce a la resistencia a la insulina (Lagathu et al., 2003; Rotter et al., 2003).

En el sistema nervioso central:

- Participa en la neuroinflamación aumentando la astrogliosis y la microgliosis (Balasingam et al., 1994; Woiciechowsky et al., 2004).
- Induce la diferenciación de neuronas (Cao et al., 2006; Hirota et al., 1996; Zhang

et al., 2007).

- Participa en la astrogliogénesis y la neurogénesis (Kang and Kang, 2008; Nakanishi et al., 2007; Vallieres et al., 2002).
- Promueve la supervivencia de varios tipos neuronales (Marz et al., 1998; Murphy et al., 2000; Schafer et al., 1999; Thier et al., 1999; Valerio et al., 2002; von Coelln et al., 1995).
- Participa en la inducción de la fiebre (Chai et al., 1996; Schobitz et al., 1995).
- Está implicada en el comportamiento emocional (Armario et al., 1998; Butterweck et al., 2003).
- Activa el eje HPA (Girotti et al., 2012).
- Participa en el dolor (Murphy et al., 1999; Ramer et al., 1998).
- Participa en la regulación del ciclo del sueño y la vigilia (Morrow and Opp, 2005)
- Participa en el aprendizaje y la memoria (Balschun et al., 2004; Heyser et al., 1997).
- Participa en el control de la homeostasis energética (Hidalgo et al., 2010; Li et al., 2002; Wallenius et al., 2002a).

En el páncreas:

- Promueve la proliferación de células α (Ellingsgaard et al., 2008).
- Regula la expresión y la secreción de glucagón (Ellingsgaard et al., 2008).

En el hígado:

- Promueve la regeneración hepática (Cressman et al., 1996).
- Induce la síntesis de proteínas de fase aguda (Fattori et al., 1994; Xing et al., 1998).
- Aumenta la producción de glucosa hepática durante el ejercicio (Keller et al.,

Introducción

2001).

- Disminuye la expresión de G6pasa (Inoue et al., 2006; Franckhauser et al., 2008).
- Inhibe la síntesis de glucógeno (Senn et al., 2002).
- Aumenta la secreción de triglicéridos (Fasshauer and Paschke, 2003; Hong et al., 2004).
- Inhibe la señalización de la insulina y aumenta el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina (Senn et al., 2002).

2. Hipótesis y objetivos

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina pleiotrópica implicada en muchos procesos biológicos, principalmente en procesos inflamatorios y en la respuesta inmune. Es producida y secretada por células del sistema inmune, como monocitos y macrófagos, pero actualmente se sabe que puede ser producida y secretada por otros tipos celulares. En la última década se ha puesto de relevancia al tejido adiposo y al músculo esquelético como los principales órganos productores y secretores de IL-6 en condiciones no inflamatorias. Diversos estudios muestran que la IL-6 estaría implicada en el control del peso corporal y del metabolismo (particularmente en funciones relacionadas con la insulina).

Nuestra hipótesis de trabajo es que ***la IL-6 producida por tejidos periféricos podría tener un papel importante en el control de la homeostasis energética y por ende en el control del peso corporal.***

2.2. Objetivos

Dado que el músculo esquelético y el tejido adiposo son los principales órganos secretores de IL-6 en situaciones no inflamatorias y que tienen un importante papel en el metabolismo, escogimos estos tejidos para estudiar nuestra hipótesis.

Los objetivos que nos planteamos fueron:

1. Obtener ratones con la delección de la IL-6 en el músculo esquelético y caracterizar el fenotipo en condiciones normales, en respuesta al frío y tras alimentarlos con una dieta grasa.

Hipótesis y objetivos

2. Obtener ratones con la delección de la IL-6 en el tejido adiposo y caracterizar el fenotipo en condiciones normales y tras alimentarlos con una dieta grasa.

3. Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Animales

3.1.1. Ratones floxados para IL-6

Para estudiar el papel de la IL-6 proveniente de diferentes tejidos se pensó en generar ratones *knock-out* condicionales específicos de tejido. La estrategia utilizada para la generación de estos ratones fue el sistema de recombinación Cre-loxP (Akagi et al., 1997), donde la recombinasa Cre reconoce las dianas loxP dando lugar a una recombinación homóloga. De esta manera, al generar un ratón que posea las dianas loxP flanqueando una región genómica (ratón floxado) podría darse la delección de esta región al cruzarlo con un ratón que exprese la recombinasa Cre y esta delección podría darse en un tejido determinado si su expresión está bajo promotores específicos de tejido (Thomas and Capecchi, 1987).

Para obtener los *knock-out* condicionales por esta estrategia el primer paso fue generar un animal floxado para el gen de la IL-6. Se escogió el exón 2 como diana, siguiendo la estrategia de Kopf et al (Kopf et al., 1994) con los ratones IL-6 KO en los que se ha demostrado que cuando el exón 2 está truncado por la presencia de una *cassette* neo no se produce la proteína (Kopf et al., 1994).

Partiendo de la secuencia genómica de la IL-6 se diseñó un constructo en el cual se clonó la secuencia del gen de la IL-6 con dianas loxP flanqueando el exón 2 dentro de un plásmido pBluescript que contenía una *cassette* Neo, para la selección positiva, flanqueado por dianas Frt, que nos permitirían poder eliminar la *cassette* Neo. También poseía los genes *Pgk-DT_A* y *HSV-TK* para la selección negativa (fig 3.1b). Una vez verificado por secuenciación que el constructo contenía las dianas loxP en la

Materiales y métodos

orientación y posición correctas, se introdujo en células 129X1/SvJ ES por electroporación. Mediante southern blot se seleccionaron 5 clones positivos que fueron inyectados en blastocitos C57Bl/6. Estos se implantaron en hembras receptoras de las que se obtuvo descendencia quimérica y se seleccionaron los animales con el transgen en la línea germinal*. Posteriormente, se retiró la *cassette* Neo cruzando estos animales con ratones FLPer (proporcionados por el Dr Benoit Viollet del departamento de metabolismo y endocrinología del *Institut Cochin* de la *Université Paris Descartes*), que expresan la recombinasa FLP que reconoce las secuencias Frt (Farley et al., 2000). A continuación se eliminó el gen FLPer cruzando la descendencia de estos animales con ratones C57Bl/6 (fig 3.1c y 3.1d). Finalmente se estableció una colonia homocigota de ratones IL-6 floxados (IL-6lox/lox).

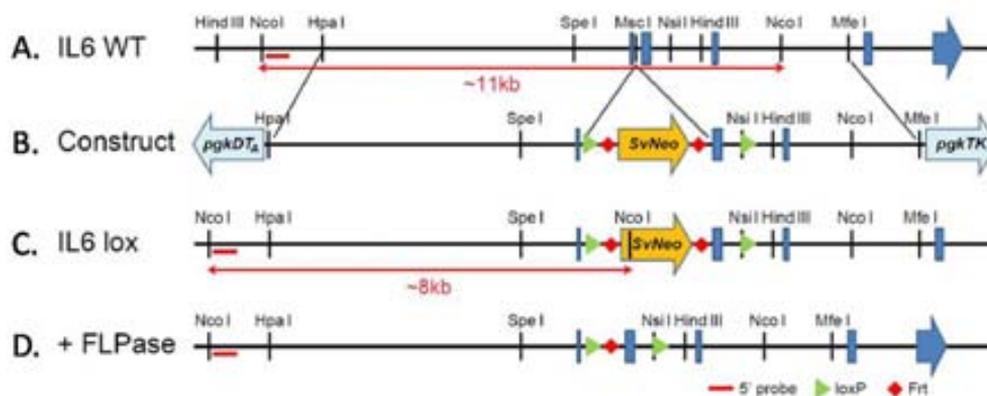


Fig 3.1: Estrategia de modificación genética dirigida utilizada para la obtención del ratón floxado para el gen de la IL-6. Figura adaptada de Quintana et al., 2013.

3.1.2. Ratones *knock-out* condicionales para la IL-6 en músculo esquelético (mIL-6 KO)

Para obtener los ratones *knock-out* condicionales para la IL-6 en el músculo esquelético (mIL-6 KO) se diseñó una estrategia de cruzamiento que permitía obtener los ratones *knock-out* condicionales junto a los controles apropiados (fig 3.2). Para ello

- Todo el trabajo explicado hasta aquí fue realizado por el Dr Albert Quintana. Parte de este trabajo se llevo a cabo en el CBATEG (Centro de biotecnología animal y terapia genética).

se realizó un primer cruce de nuestro ratón flojado para la IL-6 con un ratón que expresaba la recombinasa Cre bajo el promotor de la cadena ligera de la miosina 1f (mlc-Cre) que fue donado por el Dr. Steven Burden del *Skirball Institute of biomolecular Medicine*, de la *New York University* (Bothe et al., 2000). La descendencia de este cruce positiva para el gen de la recombinasa Cre bajo el promotor mlc y heterocigota para el gen de la IL-6 flojado (con un alelo *wild-type* (WT) y un alelo con dianas loxP) se seleccionó y cruzó de nuevo con ratones flojados para la IL-6 para obtener de esta manera los genotipos de estudio.

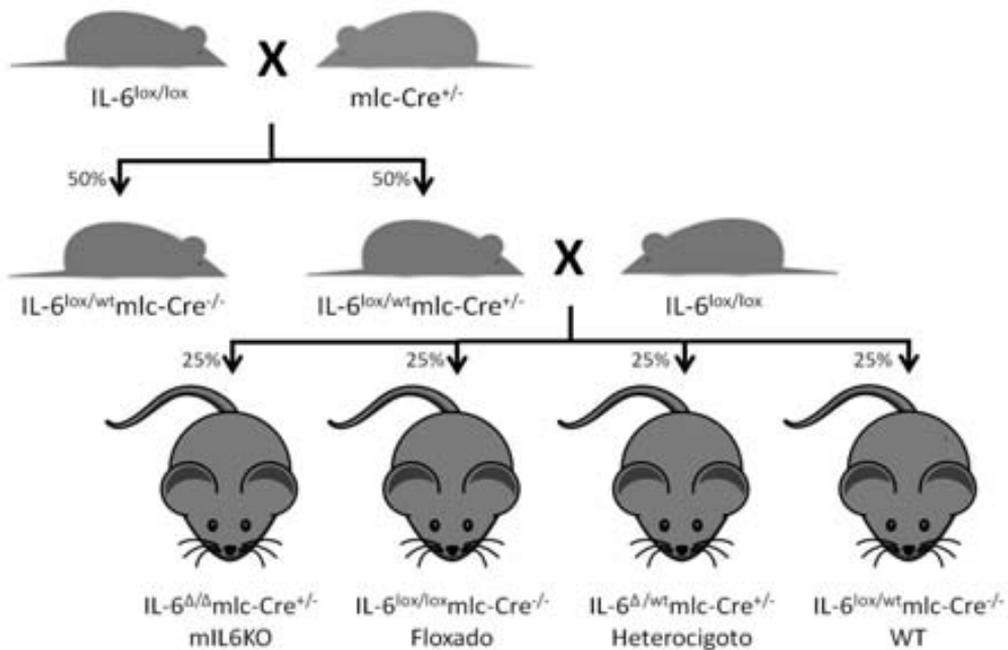


Fig 3.2: Estrategia de cruzamientos para obtener el *knock-out* condicional en el músculo esquelético.

3.1.3. Ratones *knock-out* condicionales inducibles para la IL-6 en tejido adiposo (aIL-6 KO)

Para obtener los ratones *knock-out* condicionales para la IL-6 en el tejido adiposo (aIL-6 KO) se diseñó la misma estrategia de cruzamiento que la que se utilizó para

Materiales y métodos

obtener los ratones mL-6 KO (fig 3.3). En esta ocasión se cruzó el ratón flojado para la IL-6 con un ratón que expresaba una proteína de fusión entre el dominio de unión a ligando mutado del receptor de estrógenos humano y la recombinasa Cre (Indra et al., 1999) bajo el promotor de la proteína adiposa de unión a ácidos grasos (aP2-Cre-ER^{T2}) (Ross et al., 1993). Este ratón nos fue cedido por el Dr. Pierre Chambon del *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire* de la *Université Louis Pasteur* (Imai et al., 2001). El *knock-out* obtenido como resultado final de los cruces se trataba de un modelo condicional inducible; la actividad de la proteína de fusión Cre-ER^{T2} es inducida por tamoxifeno, pero no por ligandos naturales del receptor de estrógenos.

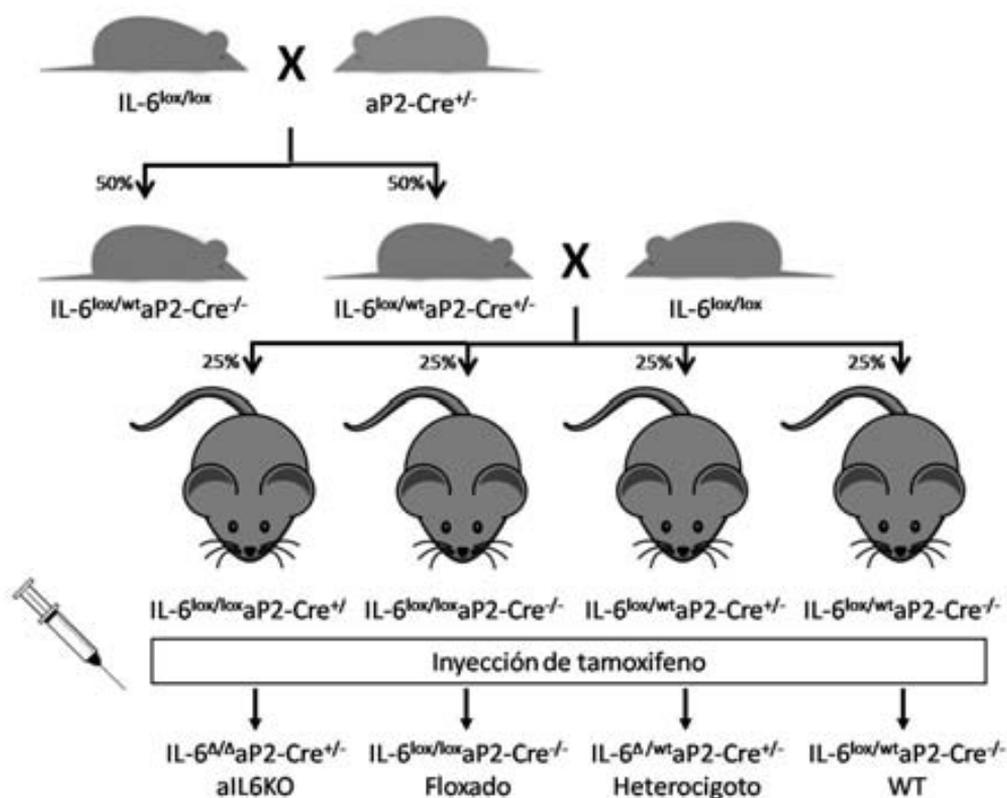


Fig 3.3: Estrategia de cruzamientos para obtener el *knock-out* condicional en el tejido adiposo.

3.1.3.1. Tratamiento con Tamoxifeno

Como se comentaba en el apartado anterior, el aIL-6 KO se trataba de un modelo inducible. De esta manera, para que tuviera lugar la recombinación era necesario tratar a estos animales con tamoxifeno (Sigma-Aldrich). Para ello se diluyó el tamoxifeno en etanol (Scharlau) obteniendo una solución de 10 mg tamoxifeno/100 µl etanol. A partir de esta solución se preparó, añadiendo aceite de girasol (Fluka) esterilizado en el autoclave, una solución stock a concentración 10 mg/ml. Esta solución se guardó a 4 °C durante varios días o bien se guardó a -20 °C (Metzger and Chambon, 2001) temperatura a la cual se conserva varios meses. A los ratones se les inyectó 1 mg/día de tamoxifeno intraperitonealmente durante 5 días consecutivos.

3.1.4. Mantenimiento de los animales

Los ratones se mantuvieron en condiciones de temperatura constante (23 ± 2 °C) y con un ciclo de oscuridad/luz de 12 h. Además disponían de agua y comida *ad libitum*.

Los ratones se destetaron a las 3 semanas de edad, se identificaron con marcas en las orejas y se separaron por sexos. Se les cortó un trocito de cola de como máximo medio centímetro que se guardó a -20 °C en microtubos para posteriormente extraer DNA y genotipar a los animales por PCR.

Los ratones *knock-out* condicionales para la IL-6, tanto en el músculo esquelético como en el tejido adiposo, fueron pesados al destete y se midieron los niveles de glucosa en sangre, obtenida de la cola, con un glucómetro ACCU CHEK (Roche).

Materiales y métodos

3.2. Genotipado de los animales a partir de cola

3.2.1. Extracción de DNA

La obtención de DNA se realizó a partir de un trocito de cola utilizando el método de extracción de DNA con hidróxido de sodio (NaOH) (Truett et al., 2000). Aunque hay otros métodos de extracción donde se obtiene DNA de mejor calidad que con este método, éste resultaba rápido y la calidad del DNA obtenido era suficientemente buena para realizar el genotipado de los ratones mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. Este método de extracción consistió en digerir el trocito de cola a 100 °C durante unos 7 minutos con NaOH a una concentración de 50mM. Una vez finalizado este proceso las muestras estaban listas para hacer la PCR o bien se guardaron congeladas a -20 °C para procesarse más tarde.

3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para genotipar a los animales se usó la técnica de la PCR. El genotipo de ambos modelos animales se determinó realizando dos PCR diferentes para cada uno de ellos. Los cebadores utilizados para las diferentes reacciones se resumen en la tabla 3.1. Los cebadores para la PCR de IL-6 floxado se diseñaron con el programa Primer3 Input (frodo.wi.mit.edu/) (Rozen and Skaletsky, 2000). El Dr Burden junto con el ratón nos recomendó un protocolo de PCR para genotipar los ratones mlc-cre donde incluyó los cebadores que utilizamos. En el caso de la PCR para aP2-cre los cebadores que se usaron eran los diseñados por Indra et al (Indra et al., 1999). Todos se solicitaron a la casa comercial Sigma-Aldrich.

Tabla 3.1: Cebadores específicos para cada PCR.

PCR	Cebador (10 pMol/μl)
IL-6 floxado	<i>Forward</i> : 5'- ccc acc aag aac gat agt ca -3'
	<i>Reverse</i> : 5'- ggt atc ctc tgt gaa gtc ctc -3'
mlc-Cre	<i>Forward</i> : 5'- aag ccc tga ccc ttt aga ttc cat tt -3'
	<i>Reverse</i> : 5'- aaa acg cct ggc gat ccc tga ac -3'
	Control interno <i>Forward</i> :5'- tca cca gat ctc gga atg g -3'
	Control interno <i>Reverse</i> :5'- aag aac cgg aat gaa tcg c -3'
aP2-Cre (Indra et al., 1999)	<i>Forward</i> : 5'- att tgc ctg cat tac cgg tc -3'
	<i>Reverse</i> :5'- atc aac gtt ttg ttt tcg ga -3'
	Control interno <i>Forward</i> :5'- tca cca gat ctc gga atg g -3'
	Control interno <i>Reverse</i> :5'- aag aac cgg aat gaa tcg c -3'

3.2.2.1. PCR para detectar el gen de la IL-6 floxado

Para detectar la presencia de los alelos floxados se diseñó una PCR que permitía detectar la presencia de las dianas loxP. Para ello se diseñaron los cebadores de manera que una de ellos reconocía una secuencia intrónica entre el exón 1 y 2 y el otro se unía al final del exón 2. Los alelos con dianas loxP daban una banda de aproximadamente 420 pb mientras que los alelos *wild-type* (sin modificaciones) daban una banda de 317 pb (fig 3.4a).

3.2.2.2. PCR para mlc-Cre

En la PCR utilizada para detectar la presencia de la recombinasa Cre en los *knock-out* condicionales para la IL-6 en músculo esquelético se utilizaron los cebadores descritos en la tabla 3.1 que nos permitían detectar la presencia del gen de la recombinasa Cre. Los ratones que contienen este gen bajo el promotor mlc presentaban una banda de 410 pb (fig 3.4b), mientras que los animales

Materiales y métodos

negativos no daban ninguna banda. Dada esta situación, para descartar falsos negativos, a la PCR se le añadió un control interno (tabla 3.1), que consistió en añadir *cebadores* para detectar el gen de la metaloteoneina 1 y 2 (Mt1+2) (West et al., 2008). Con estos cebadores se obtenía una banda de unos 200 pb en todas las muestras.

3.2.2.3. PCR para aP2-Cre

Los cebadores que se usan en esta PCR reconocen los extremos 5' y 3' del gen de la recombinasa Cre, de manera que los ratones positivos para la recombinasa Cre bajo el promotor de la proteína adiposa de unión a ácidos grasos presentaban una banda de 349 pd (fig 3.4c), mientras que los animales negativos no daban ninguna banda. Al igual que en el caso de los mL-6 KO, se utilizaron también los cebadores de la Mt1+2 (West et al., 2008) como control interno para descartar falsos negativos.

3.2.2.4. Procedimiento general de realización de la PCR

En todas las PCR se usó 1 µl de DNA extraído de cola de ratón por el método del NaOH. Las proporciones por muestra de los diferentes reactivos utilizados para cada una de estas PCR se indican en la tabla 3.2.

En todos los casos se añadió una gota de aceite mineral para prevenir la evaporación de las muestras durante los ciclos de la PCR. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene). Los programas utilizados en cada PCR se hayan resumidos en la tabla 3.3.

Tabla 3.2: Reactivos y proporciones de los reactivos de las diferentes PCRs.

Reactivos	IL-6 Floxado	mlc-CRE	aP2-Cre
Tampón polimerasa (Tris HCl 750 mM (pH 9,0), KCl 500 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM) 10x (biotools)	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
MgCl ₂ 25 mM (biotools)	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (<i>GeneCraft</i>)	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Cebador <i>Forward</i>	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Cebador <i>Reverse</i>	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Cebador control interno <i>Forward</i>	-	1 µl	1 µl
Cebador control interno <i>Reverse</i>	-	1 µl	1 µl
Taq Polimerasa 1000u/ml (biotools)	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
Agua milliQ	6,25 µl	4,25 µl	4,25 µl
DNA	1 µl	1 µl	1 µl

Tabla 3.3: Condiciones optimizadas de amplificación de las diferentes PCRs.

Paso amplificación	IL-6 Floxado			mlc-CRE			aP2-Cre		
	T °C	t (s)	nº	T °C	t (s)	nº	T °C	t (s)	nº
Desnaturalización	-	-	-	94	120	1	94	30	1
Desnaturalización	94	70	33	94	30	30	94	30	30
Alineamiento	55	70		55	30				
Elongación	72	70		72	60				
Elongación	-	-	-	72	300	1	-	-	-

Una vez finalizada la PCR las muestras se visualizaron en un gel de agarosa (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA) al 2% teñido con *Sybr®safe DNA gel* (Invitrogen Crop, CA).

Materiales y métodos

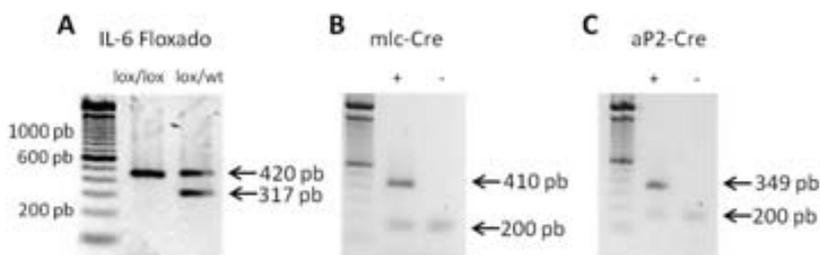


Fig 3.4: Electroforesis en gel de agarosa de las diferentes PCRs. A. PCR para IL-6 floxado, la banda 420 pb corresponde al alelo de la IL-6 con dianas loxP, la banda de 317 pb es el alelo *wild type*. B. PCR para mlc-Cre, los animales positivos dan una banda a 410 pb. C. PCR para aP2-Cre, los animales positivos dan una banda de 349 pb. Tanto en la figura B como en la C la banda de 200 pb corresponde al control interno de la PCR.

3.2.3. Genotipado de los animales a partir de tejido

A partir de las muestras de tejido obtenidas después del sacrificio se realizó la extracción de DNA para analizar si se había deletado el exón 2 de la IL-6 en el músculo esquelético o en el tejido adiposo en los *knock-out* condicionales de cada uno de los modelos animales que fueron estudiados. El DNA obtenido se analizó mediante PCR.

3.2.3.1. Extracción de DNA

Se realizó la obtención de DNA de diferentes tejidos (músculo, tejido adiposo visceral, tejido adiposo subcutáneo, hígado, tejido adiposo marrón...). Dado el tipo de tejidos que se iban a analizar y para garantizar la obtención de DNA se optó por realizar la siguiente extracción. Los diferentes tejidos fueron digeridos durante toda la noche a 55 °C con 0,5 mg/ml de proteinasa K (Roche). A continuación se incubó 1 h a 37 °C con 1 µl de RNAsa A (Roche) a 10 mg/ml para eliminar el RNA que pudiera haber. Se añadió 0,5 ml de fenol/cloroformo (Sigma-Aldrich) para desnaturalizar proteínas, y después de centrifugar a 15.000 xg se recolectó la fase acuosa a la que se le añadió 0,5 ml de cloroformo (Sigma-

Aldrich) para eliminar restos de fenol. Se recogió de nuevo la fase acuosa y finalmente se precipitó el DNA con 0,75 ml de etanol absoluto (Scharlau).

3.2.3.2. PCR para detectar la delección del exón 2 de IL-6

El DNA obtenido se analizó con la técnica de PCR descrita en el apartado 3.2 y se utilizaron el programa y los reactivos descritos en las tablas 3.5 y 3.6. La PCR utilizada para este propósito fue una modificación de la PCR para detectar el gen de la IL6 flojado. Se utilizó el cebador *forward* de esa PCR y se cambió el cebador *reverse* por uno que reconoce una región de la secuencia intrónica entre el exón 2 y 3 (tabla 3.4), de esta manera la banda para el gen *wild-type* tenía un tamaño de aproximadamente 900 pb, el gen flojado daba una banda alrededor de los 1000 pb y si el gen estaba delecionado se obtenía una banda de aproximadamente 260 pb. Se muestra una imagen de las bandas obtenidas en las figuras 4.1 y 4.42 en el apartado de Resultados.

Tabla 3.4: Cebadores específicos para la detección de la delección.

PCR	Cebador (10 pMol/μl)
IL-6 KO condicional	<i>Forward</i> : 5'- ccc acc aag aac gat agt ca -3'
	<i>Reverse</i> : 5'- atg ccc agc cta atc tag gt -3'

Tabla 3.5: Condiciones de amplificación para la detección de la delección.

Paso amplificación	Programa		
	T °C	t (s)	nº cycles
Desnaturalización	94	70	33
Alineamiento	55	70	
Elongación	72	70	

Materiales y métodos

Tabla 3.6: Reactivos necesarios para la detección de la delección.

Reactivos	Vol.
Tampón polimerasa (Tris HCl 750 mM (pH 9,0), KCl 500 mM, ((NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM) 200 mM) 10x (biotools))	2 µl
MgCl ₂ 25 mM (biotools)	1 µl
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (<i>GeneCraft</i>)	2 µl
Cebador <i>Forward</i>	0,5 µl
Cebador <i>Reverse</i>	1,5 µl
Taq Polimerasa 1000u/ml (biotools)	0,5 µl
Agua milliQ	12,5 µl
DNA	1 µl

3.3. Experimentos

Todos los procedimientos experimentales realizados fueron aprobados por la *Comissió d' Ètica en l'Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona*.

3.3.1. Obesidad inducida por una dieta grasa

3.3.1.1. Dietas

Se estudió el efecto de la dieta grasa en ambos modelos de *knock-out* condicional para la IL-6. Para ello un grupo fue alimentado con una dieta grasa (Teklad, TD 03584, Madison, USA 35% dieta grasa, HarlanTM) (tabla 3.7) de la que el 58,4% de las kcal de la dieta provenían de la grasa de la dieta y comparado con un grupo alimentado con dieta control (dieta completa para ratón y rata, HarlanTM) (tabla 3.7) en la que las kcal provenientes de la grasa de la dieta eran el 18%.

Tabla 3.7: Composición calórica de las dietas.

	Dieta control	Dieta grasa
Kcal proveniente de proteínas	24,0	15,0
Kcal proveniente de carbohidratos	58,0	26,6
Kcal proveniente de grasa	18,0	58,4
Densidad de energía (Kcal/g)	3,1	5,4

3.3.1.2. Descripción del experimento de dieta

Los ratones mL-6 KO entraron en dieta a las 4 semanas de vida. En el caso de los ratones aIL-6 KO entraron en dieta entre la semana 6 y 15 de vida debido al funcionamiento de los cruces; antes de entrar en dieta se les hizo el tratamiento con tamoxifeno para inducir la delección de la IL-6.

Los ratones estuvieron en dieta entre 13 y 14 semanas durante las cuales se les hizo seguimiento del peso corporal, de la ingesta y de los niveles de glucosa circulante.

A la semana 10 y a la semana 11 se realizó un test de tolerancia a la insulina (ITT) y un test de tolerancia a la glucosa oral (OGTT).

Este experimento se realizó en ambos modelos dos veces. La segunda vez que se realizó no se hicieron los test de ITT y OGTT y en su lugar hacia la semana 12 de dieta se realizaron pruebas de conducta para evaluar la actividad de los ratones mL-6 KO.

3.3.1.2.1. Seguimiento del peso y la ingesta

El seguimiento del peso se hizo semanalmente, mientras que la ingesta se

Materiales y métodos

controló dos días a la semana. Debido al espacio del que disponíamos no se pudo enjaular a los animales individualmente, que hubiera sido lo más apropiado. Reconociendo las limitaciones del sistema usado, se optó por enjaular en una misma caja hasta un máximo de 5 ratones con el mismo genotipo. Se calculó la ingesta como la diferencia entre la comida puesta menos la que quedaba y se dividió entre el número de días transcurridos y el número de animales por jaula. De esta manera los valores de ingesta se expresaron en g/día/animal. También se calcularon las calorías ingeridas por animal y día a partir de la densidad energética de la dieta. La eficiencia alimentaria se calculó como el ratio de ganancia de peso corporal en g/kcal consumidas (Zorrilla et al., 2007).

3.3.1.2.2. Niveles de glucosa circulante

Los niveles de glucosa circulante se midieron al inicio de la dieta, a las semanas 2, 6, 10 y 11 y tras el sacrificio. Cuando esta medida se realizó en el animal vivo, se usó un glucómetro ACCU CHECK (Roche) en una gota de sangre obtenida de la cola del animal. La glucosa tras el sacrificio se valoró como se describe en el apartado 6.1 de los materiales y métodos.

3.3.1.2.3. Test de tolerancia a la insulina (ITT)

Esta prueba consistió en privar de la comida 4 h antes del experimento a los ratones para homogeneizar la situación metabólica de los animales. Pasado este tiempo se les inyectó intraperitonealmente 1,5 U de insulina (Sigma-Aldrich) por kg de animal. Se midió el nivel de glucosa circulante a partir de una gota de sangre obtenida de la cola del ratón con un glucómetro ACCU CHECK (Roche) antes de la inyección de insulina, y a los 15, 60, 120 y 180 minutos.

3.3.1.2.4. Test de tolerancia a la glucosa oral (OGTT)

Los ratones fueron privados de la comida 18 h antes de realizar el test y se les administró oralmente 2 g de glucosa (Sigma-Aldrich) por kg de ratón. Se determinó la glucemia a diferentes tiempos: antes de la administración y a los 15, 60, 120 y 160 minutos a partir de una gota de sangre obtenida de la cola del ratón con un glucómetro ACCU CHECK (Roche). A los 15 minutos de la administración de glucosa oral se recogió una muestra de sangre con un capilar Microvette → CB 300K2E (Sarstedt). Se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Biofuge Freco (Heraeus) para obtener el plasma que se almacenó a -80 °C.

3.3.1.3. Respuesta a la insulina

El experimento de respuesta a la insulina se realizó a ratones mL-6 KO de 13 semanas de dieta, tanto con dieta grasa como con dieta control. Para ello se privó a los animales de la comida 4 h antes de la realización del experimento. Pasado este tiempo se les inyectó 1 U de insulina (Sigma-Aldrich) por animal intraperitonealmente y se sacrificaron 30 minutos más tarde. Como animales control se utilizaron animales inyectados con vehículo (solución salina (0,9% NaCl) + 5% de albúmina, en una relación 1:25). El protocolo de eutanasia seguido fue el mismo que en el caso de los animales del experimento de dietas (ver apartado 3.5 de *Materiales y métodos*).

3.3.2 Exposición al frío

Este experimento se realizó en ratones mL-6 KO y consistió en enjaular individualmente a los animales y situarlos a 4 °C. Se tomó la temperatura rectal al inicio del experimento y a las 2, 4 y 6h.

Materiales y métodos

3.4 Tests de conducta

A los ratones mL-6 KO se les sometió a varias pruebas de conducta. Una semana antes de aplicar los test de conducta los animales fueron habituados a la sala y a la manipulación con sesiones diarias donde los ratones eran cogidos, como se haría el día de la realización del test, y acariciados varias veces. Una hora antes de iniciar los test los ratones se introdujeron en la sala donde se iba a realizar el test. Los aparatos utilizados para los tests se limpiaron entre animal y animal con etanol al 5% para eliminar olores que pudieran interferir en el desarrollo de la prueba.

3.4.1 Tabla de agujeros (*hole board test*)

Este test se realizó con el grupo de animales mL-6 KO a las doce semanas de dieta, tanto en animales alimentados con dieta control como con dieta grasa. El aparato para realizar la tabla de agujeros o *hole board test* (HB) es una cámara de campo abierto de madera de color blanco de 40x40x10 cm con cuatro agujeros equidistantes de 3 cm de diámetro y dividida en 16 cuadrantes idénticos de 10x10 cm. Este aparato se sitúa, aproximadamente, a 60 cm del suelo (fig 3.5).

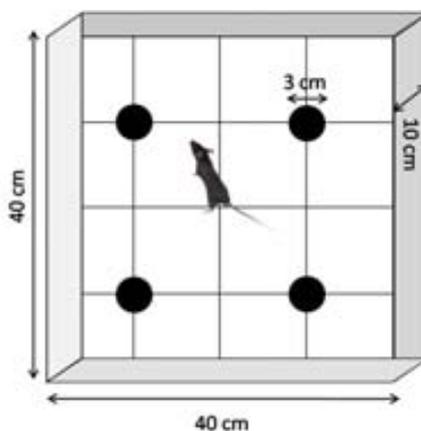


Fig 3.5: Esquema del aparato de Hole Board.

Utilizamos este test para evaluar tanto la actividad exploratoria como la actividad locomotora. Para su realización se situaba al ratón en medio de la tabla y se le dejaba explorar libremente 5 minutos. Durante este tiempo se contaron las veces que atravesaban las diferentes secciones (actividad horizontal) y el número de veces que se incorporaban sobre las patas traseras (actividad vertical). También se contabilizó el número de veces que el ratón introducía la cabeza en los agujeros (número de *head*

dips), así como el tiempo que permanecía con la cabeza dentro de los agujeros.

3.4.2. Batería de test sesorimotores

Se usaron aparatos diferentes para realizar este test y se realizó en un grupo de ratones mLL-6 KO de unas 16 semanas de vida alimentados con dieta control que no habían participado en el experimento de dieta.

3.4.2.1. Barra horizontal plana

Para esta prueba se usó una barra horizontal de madera plana de 1 cm de ancho por 50 cm de largo que estaba dividida en secciones de 5 cm y elevada 40 cm del suelo (fig 3.6a). Este test se usó para evaluar el equilibrio y la función motora en general del ratón. Para ello, se colocó al animal en el centro de la barra y se evaluó la distancia que recorrió el animal en 20 segundos. También se miró el tiempo de latencia a la caída, es decir, cuanto tiempo se mantenía en la barra antes de caerse. Este test se realizó dos veces con un intervalo de descanso de 10 segundos entre prueba y prueba. Se analizó la suma de la distancia recorrida y el promedio de latencia de las dos pruebas.

3.4.2.2. Barra horizontal circular

Este test consistió en una barra cilíndrica de metal de 1 cm de diámetro por 50 cm de largo dividida en secciones de 5 cm y elevada del suelo unos 40 cm (fig 3.6b).

Al igual que la barra de madera plana, esta prueba también se usó para evaluar el equilibrio, pero en una superficie más deslizante, donde era más difícil mantenerse. Para realizar la prueba los ratones se situaron en el centro de la barra y durante 20 segundos se contaron los desplazamientos realizados en la

Materiales y métodos

barra, así como el tiempo de latencia a la caída. Este test también se realizó dos veces con un intervalo de descanso de 10 segundos. Para el análisis de los datos se sumó la distancia recorrida en cada prueba y se calculó el promedio de latencias.

3.4.2.3. Test de la percha

Esta prueba consiste en una varilla horizontal de metal de 1,8 mm de diámetro por 40 cm de largo, flanqueada por dos barras diagonales de 22 cm de largo y con una inclinación de 35°, esta estructura tenía forma de percha (fig 3.6c) y estaba colgada a 70 cm del suelo. En el suelo se colocó un cojín para amortiguar la caída de los ratones en caso de que cayeran. La barra horizontal y las diagonales estaban divididas en secciones de 5 cm. Con este test se evaluó la coordinación motora, así como la capacidad de agarre con las patas (fuerza prensil) y la resistencia. La primera parte de la prueba consistió en dos ensayos donde se colocaba al ratón en el centro de la parte horizontal de manera que se agarrase con las patas delanteras durante 5 segundos, donde se midió la capacidad del animal de mantenerse agarrado (test de fuerza prensil). Los tiempos en que tardó en caerse de los dos ensayos se sumaron. La segunda parte de la prueba consistió en colocar al ratón en la parte central de la barra horizontal sujetado por las patas delanteras, como en el caso anterior, pero en esta ocasión el tiempo de la prueba fue de 60 segundos. Se contabilizó la distancia recorrida y la latencia a caer (test de fuerza).

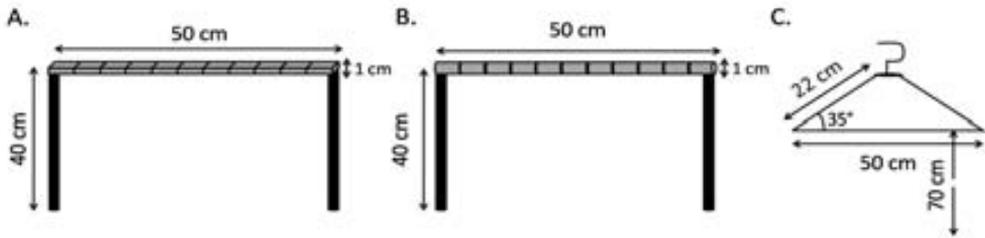


Fig 3.6: Esquema de los aparatos de la batería de tests sensorimotrices. A. Barra horizontal plana. B. Barra horizontal circular. C. Test de la percha.

3.4.3. Barra giratoria (*Rotarod test*)

Con esta prueba también se evalúa la coordinación motora. La prueba consistió en hacer caminar al animal en una barra giratoria. El aparato utilizado fue un *Rota-rod Treadmill* modelo 7600 (Ugo Basile) que consta de una barra giratoria, la velocidad de la cual es regulable (fig 3.7). Para este test se utilizaron dos velocidades, a 16 rpm y a 32 rpm. El aparato utilizado permite hacer la prueba simultáneamente hasta 5 ratones. El *rotarod* se realizó cinco días consecutivos, los dos primeros eran los días de entrenamiento y los tres últimos días se consideraban propiamente el test. Durante los días de entrenamiento los animales se colocaban en la barra giratoria a 16 rpm de velocidad durante 5 min. Los días del test el procedimiento era diferente: primero se colocaron los animales en el aparato a velocidad lenta, 16 rpm, durante 5 minutos y se devolvieron a la caja. Una hora después se inició la segunda parte del test. En esta ocasión, los animales se pusieron en la barra giratoria a 32 rpm durante 5 min. En ambas partes del test se contabilizó el número de caídas así como el tiempo de latencia a la primera y segunda caídas.



Fig 3.7: Aparato de Rotarod donde se realizó el test de la barra giratoria

Materiales y métodos

3.5. Eutanasia de los animales y toma de muestras

Los ratones fueron sacrificados por decapitación. En el experimento de dietas y en el de respuesta a la insulina se extrajeron el hígado, el tejido adiposo visceral, el tejido adiposo subcutáneo y el tejido adiposo marrón, que fueron pesados. Los datos de peso de estos tejidos se expresaron como peso absoluto y como porcentaje de peso respecto al peso total del animal (peso relativo). De estos tejidos se hicieron tres trozos, uno se congeló en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C, otro se congeló en *Tissue-Teck* → *OCT* (Sakura Finetek Europe) y el tercero se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato 0,1 M durante 24 h a 4 °C, luego se lavaron dos veces con tampón fosfato salino 0,1 M (PBS) y fueron almacenados a 4 °C en etanol al 70%.

Se extrajeron también el cerebro y los músculos gastrocnemio, tibialis y soleo, de los cuales se peso el músculo tibialis. El cerebro se congeló progresivamente en nieve carbónica y se almaceno a -80 °C. Los músculos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Se obtuvo la tibia derecha de los ratones que se dejó en agua durante varios días para luego limpiar todo el hueso de musculatura y medir con un pie de rey su longitud. Este dato se usó como indicador del tamaño y crecimiento de los ratones.

Se obtuvo también la sangre al decapitar a los animales. Se centrifugó a 10000 xg durante 10 minutos a 4 °C en una centrifuga Biofuge Freco (Heraeus) para obtener el suero que se almacenó a -80 °C.

3.6. Determinación de metabolitos

Los metabolitos se evaluaron en las muestras obtenidas en los experimentos de dietas y respuesta a la insulina.

3.6.1. Determinación de metabolitos circulantes: triglicéridos, colesterol y glucosa

A partir del suero obtenido de los ratones mLL-6 KO y aLL-6 KO como se explica en el apartado 5 de los *Materiales y métodos*, o bien del plasma obtenido de la muestra de sangre tomada a los 15 minutos de la administración de glucosa oral en la OGTT (apartado 3.3.1.2.4. de los *Materiales y métodos*) en los ratones aLL-6 KO, se determinaron los niveles de triglicéridos, colesterol y glucosa circulantes. Para ello se utilizaron diferentes métodos enzimáticos colorimétricos.

Para la determinación de los triglicéridos se utilizó un kit de cromatest (Linear Chemicals S.L.) basado en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos séricos a glicerol y ácidos grasos libres por acción de la lipoproteína lipasa.

Para la determinación del colesterol se utilizó un kit de cromatest (Linear Chemicals S.L.) basado en el uso de tres enzimas: la colesterol esterasa, la colesterol oxidasa y la peroxidasa.

Para la determinación de la glucosa se utilizó un kit Glucose RTU™ (Biomérieux S.A.) basado en el uso de la glucosa oxidasa y la peroxidasa.

En los tres casos se dio una reacción en la que se obtuvo peróxido de oxígeno, el cual permitió la formación de un cromógeno proporcional a la concentración de los metabolitos determinados en la muestra.

Materiales y métodos

3.6.2. Determinación de hormonas circulantes: Insulina y leptina

A partir del suero o plasma obtenido como se explica en el apartado 3.5 de los *Materiales y métodos*, se evaluaron los niveles de insulina y leptina circulantes.

Los niveles de insulina circulante de los animales del experimento de dietas se midieron con un *Mouse Insulin RIA kit* (Cat. # SRI-13K, Millipore). Los niveles circulantes de insulina en el plasma obtenido de la muestra de sangre tomada a los 15 minutos de la administración de glucosa oral en la OGTT se usó el *Rat/Mouse Insulin ELISA kit* (Cat. # EZRMI-13K, Millipore).

Para la determinación de la leptina circulante se usó un *Mouse leptin RIA kit* (Cat. # ML-82K, Millipore).

3.7. Análisis histológicos

3.7.1. Esteatosis hepática

Se determinó la acumulación de grasa en el hígado (esteatosis hepática) mediante la tinción con aceite de rojo O (ORO), que es una tinción específica para lípidos neutros, principalmente triglicéridos, que se tiñen de color naranja-rojo. Las muestras de hígado conservadas en OCT fueron cortadas a 10 μm con un criostato Leica CM 3050 S y guardados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para realizar la tinción se siguió el protocolo descrito en la tabla 3.8.

Tabla 3.8: Protocolo de tinción de lípidos neutros con ORO

Incubaciones/lavados
40 minutos a temperatura ambiente
10 minutos con PFA al 4%
3 x 30 segundos en agua destilada
2 minutos con 1,2-propilenglicol al 100%
15 minutos con solución de ORO al 0,5% a temperatura ambiente agitando
2 minutos con 1,2-propilenglicol al 85%
5 minutos con hematoxilina de Mayer
Lavar con agua del grifo
Montar con <i>Dako Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium</i>
20 minutos a 70 °C

Se tomaron fotografías a 20x con el microscopio Nikon eclipse 90i acoplado a una cámara DXM 1200F usando el programa ACT-1 versión 2.70 (Nikon corporation). Se fotografiaron un mínimo de 10 campos distintos por muestra y se analizó el área relativa de esteatosis, expresada como porcentaje de tinción de ORO con el software ImageJ (Abramoff et al., 2004) desarrollado por *US National Institutes of Health* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.7.2. Número y tamaño de los adipocitos

Las muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo previamente fijado con PFA y almacenadas en etanol al 70%, fueron incluidas en parafina usando un sistema automático de inclusión de tejidos Leica TP 1020 y cortadas a 8 µm con un microtomo manual Leica RM 2135. Los cortes histológicos se guardaron a temperatura ambiente.

Los cortes se desparafinaron (tabla 3.9), y se tiñeron con hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich), que se diferenció con alcohol clorhídrico, se lavaron y se tiñeron con

Materiales y métodos

eosina (Sigma Aldrich). Finalmente se hizo la deshidratación y se montaron los portaobjetos con DPX (tabla 3.9).

Tabla 3.9: Protocolo de tinción con hematoxilina y eosina

Incubaciones/lavados	
Desparafinación	3 x 10 minutos con xilol
	2 x 5 minutos con etanol al 100%
	5 minutos con etanol al 90%
	5 minutos con etanol al 70%
	5 minutos con etanol al 50%
	5 minutos con agua del grifo
Tinción	8 minutos con hematoxilina de Harris
	Lavar con agua del grifo
	Diferenciar 8 segundos con HCl al 1% en etanol al 70%
	Lavar con agua del grifo
	5 minutos con eosina
Deshidratación	5 minutos con etanol al 70%
	5 minutos con etanol al 96%
	5 minutos con etanol al 100%
	2 x 5 minutos xilol
Montaje	Montar cubreobjetos con DPX

Se tomaron fotografías a 40x con un microscopio Nikon Eclipse E400 acoplado a una cámara DXM 1200. Para determinar el tamaño de los adipocitos se midió el área de, al menos, 300 adipocitos por animal con el programa ImageJ (Abramoff et al.; 2004). El número de adipocitos se determinó utilizando el método descrito por Lemonnier (Lemonnier, 1972). Siguiendo este método se calculó el volumen del adipocito (V) a partir del área del adipocito (S) usando la fórmula

$V = 4 \cdot S^{3/2} / (3 \cdot \sqrt{\pi})$. Para calcular el número de células se dividió el peso del tejido adiposo entre el volumen del adipocito y se multiplicó por 0,92 g/cm³, que es la densidad estimada para el tejido adiposo ((peso tejido/volumen adipocito) X 0,92).

3.8. Determinación del glucógeno hepático

A partir de muestras de hígado se determinó su contenido de glucógeno. Para ello se digirió un trocito de tejido de peso conocido con 1,5 ml de hidróxido de potasio al 40%, 30 minutos al baño maría. Se precipitó el glucógeno con etanol absoluto a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 1000 xg durante 20 minutos y se obtuvo un pellet que se resuspendió en 1 ml de agua destilada. Se hizo una dilución 1/20 de las muestras y se preparó una curva de glucosa. A 200 µl de las diluciones y de la curva se le añadió 2,1 ml de reactivo de antrona (Sigma-Aldrich) (al 0,05% en 72% de ácido sulfúrico) y se incubaron al baño maría durante 15 minutos. Una vez las muestras estuvieron frías se leyó su absorbancia a 620 nm. Se calcularon los valores de glucógeno de las muestras con la curva patrón y teniendo en cuenta la relación ponderal entre el glucógeno y la glucosa (1 g de glucógeno equivale a 1,1 g de glucosa). El resultado final se expresó en mg de glucógeno/g de hígado.

3.9. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se usó el método descrito por Chomczynski (Chomczynski, 1993). Se utilizaron muestras de diferentes tejidos (hígado, músculo gastrocnemio, tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo), almacenadas a -80 °C, que se homogeneizaron mecánicamente en el reactivo *TriPure → Isolation Reagent* (Roche) con un molino mezclador MM 400 (Retsch). El RNA se extrajo utilizando 0,2 ml de cloroformo (Sigma-Aldrich) y se precipitó con 0,5 ml de isopropanol (Sigma-Aldrich), se lavó con 1 ml de etanol al 75% (Scharlau) y se disolvió en agua destilada

Materiales y métodos

tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Las muestras de RNA se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Se cuantificó la concentración de RNA extraído con el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, CA) y se analizó la calidad del RNA con un *ExperionTM RNA StdSens Analysis Kit* (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA)).

3.10. Real Time PCR (RT-qPCR)

Para realizar la real time PCR el RNA extraído se retrotranscribió a cDNA usando el kit *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se almacenó a -20 °C. Se verificó la correcta generación de cDNA con una PCR convencional utilizando los *cebadores* del gen de referencia Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa(GAPDH) (tabla 3.10).

La reacción de RT-qPCR se llevó acabo en un termociclador CFX 384 (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA). Esta contenía 5 µl de *SYBR Green SuperMix* (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA), 0,5 µl de cebador *forward* y 0,5 µl de cebador *reverse* (500 nM) (tabla 3.10) y 2,5 µl de cDNA. Los cebadores se diseñaron con el programa Primerbank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) (Wang et al., 2012) y adquiridos a Sigma-Aldrich.

El programa utilizado tenía un primer paso de desnaturalización a 95 °C de 5 minutos, un segundo paso de 40 ciclos a 95 °C durante 10 segundos seguidos, de 30 segundos a 60 °C. Finalmente se hizo la curva de fusión (*melting curve*), que consistió en 31 repeticiones de 10 segundos empezando a 55 °C con incrementos de temperatura de 0,5 °C hasta llegar a 95 °C.

Tabla 3.10: Cebadores de los genes analizados por RT-qPCR.

Gen	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>
IL-6	5'-gcttaattacacatgttctctgggaaa-3'	5'-caagtgcacatcatcgttggtcatac-3'
G6pasa	5'-ctgtttggacaacgccgtat- 3'	5'-aggtgacaggggaactgcttta- 3'
PEPCK	5'-ctgcataacggctctggacttc- 3'	5'-cagcaactgccctactcc- 3'
PGC1- α	5'-aaccagtacaacaatgagcctg- 3'	5'-aatgagggcaatccgtcttca- 3'
MCP1	5'-ctcacctgctgctactcattccac- 3'	5'-ttccttcttggggctcagcac- 3'
LPL	5'-gagagcgagaacattcccttca- 3'	5'-tccacctccgtgtaaatcaaga- 3'
Leptina	5'-ggctttggtcctatctgtcttatgttc- 3'	5'-ccctctgcttggcggatacc- 3'
ACC-1	5'-gatgaacctctccgttggc- 3'	5'-cccaattatgaatcgggagtgc- 3'
FAS	5'-agtggtgatagccggtatgt- 3'	5'-tgggtaatccatagagcccag- 3'
PFK-Hígado	5'-ggaggcgagaacatcaagcc- 3'	5'-cggccttccctcgtagtga- 3'
PFK-Músculo	5'-tgtgtccgagttggtatctt- 3'	5'-gcacttcaatcactgtgcc- 3'
F4/80	5'-atggacaaccaacttcaaggc- 3'	5'-gcagactgagtaggaccacaa- 3'
TNF- α	5'-atggcccagaccctcaca- 3'	5'-tgctacgacgtgggctaca- 3'
IL1- β	5'-gggctgcttcaaactttg- 3'	5'-tgatactgcctgcctgaagctc- 3'
UCP2	5'-tgcccgtaatgccattgtc- 3'	5'-agtggcaagggaggtcatct- 3'
GAPDH	5'-ggcaaattcaacggcaca- 3'	5'-cggagatgatgacccttt- 3'

Las muestras se analizaron en duplicado y los machos y las hembras se analizaron por separado. Los datos fueron normalizados con el gen de referencia GAPDH (Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa). Para analizar los datos obtenidos se utilizó el *software* CFX Manager 2.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA). Estos se expresan como “inducción”.

3.11. Análisis estadísticos

Todos los datos obtenidos fueron analizados utilizando el *Statistical Package for*

Materiales y métodos

Social Sciences (SPSS) versión 19.0.

Los machos y las hembras fueron analizados por separado. Los datos se analizaron usando el Modelo Lineal Generalizado (GzLM; McCulloch and Shayle, 2001). Para los datos de medidas repetidas, como en el caso del incremento de peso o los test de tolerancia a la insulina y a la glucosa, en el aprendizaje en el test de *Rotarod* o en los experimentos de resistencia al frío, se utilizó el análisis GzLM con medidas repetidas (Ecuaciones Estimadas Generalizadas, GEE; (Hardin and Hilbe, 2003), usando el tiempo como un factor intrasujetos. En estas figuras, con la finalidad de mostrar los datos más relevantes, sólo se indicarán las interacciones relacionadas con la dieta y el genotipo indicando si hay interacción con el factor tiempo en el pie de figura.

El GzLM es una herramienta estadística más flexible que el modelo lineal general estándar (GLM) porque admite varios tipos de distribución así como, diferentes estructuras de covarianzas de las medidas repetidas. Además el GzLM no requiere de homogeneidad de varianzas y admite la falta de valores en las medidas repetidas sin eliminar el resto de datos del sujeto. La significación de los efectos fue determinada por la chi cuadrado de Wald seguida de comparaciones por pares. Cuando el número de comparaciones excedió los grados de libertad se realizó un ajuste de Bonferroni secuencial adicional (para la descomposición de la interacción y factores de más de 2 niveles).

La significación estadística fue definida como $p \leq 0,05$. Todos los datos fueron expresados como media \pm SEM (error estándar de la media). En la representación de las figuras se indicaran las diferencias respecto al control correspondiente, tanto en la descomposición de las interacciones, como en los casos en los que sólo sean significativos los factores genotipo (★), dieta (▲) o tratamiento con insulina(●).

4. Resultados

4. Resultados

4.1. *Knock-out* condicionales para la IL-6 en músculo esquelético

4.1.1. Caracterización en condiciones basales

4.1.1.1. Efecto de la deficiencia de IL-6 muscular en la supervivencia

La deficiencia de IL-6 en músculo esquelético no mostró ningún efecto en la supervivencia, ya que el análisis de las frecuencias de estos ratones mostró las ratio mendelianas esperadas (tabla 4.1).

Tabla 4.1: Tabla de contingencia: Muestra las frecuencias de genotipos y sexos en el destete. El análisis de la χ^2 de las crías muestra que no hay efecto de la deficiencia de IL-6 en las frecuencias de los genotipos ($\chi^2(3, n = 1012) = 0,680, p = 0,878$). La distribución de sexos también fue la esperada ($\chi^2(1, n = 1012) = 3,324, p = 0,068$).

Genotipo	N observada	N esperada	Residual
WT	264	253	11,0
Heterocigoto	248	253	-5,0
Floxado	252	253	-1,0
mIL-6 KO	248	253	-5,0
Total	1012		

Sexo	N observada	N esperada	Residual
Hembras	535	506	29,0
Machos	477	506	-29,0
Total	1012		

Resultados

4.1.1.2. Efectividad de la delección del exón 2 por la recombinasa Cre

Por PCR convencional, utilizando cebadores que reconocen una secuencia en el exón 1 y en la región intrónica entre el exón 2 y 3, se analizó si se había producido la delección del exón 2 de la IL-6 en el músculo esquelético. Los resultados mostraron que se había producido la delección de la IL-6 de forma específica en el músculo esquelético (fig 4.1).

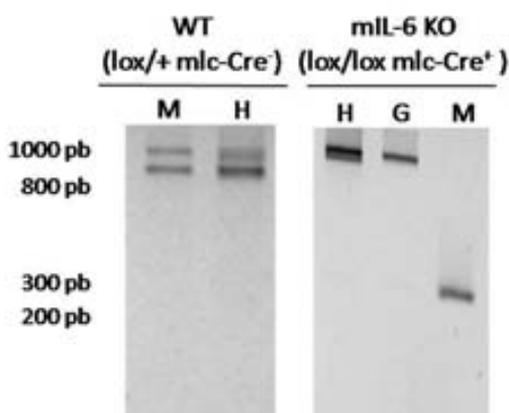


Fig 4.1: PCR para la delección del exón 2 de la IL-6. El ratón *wild-type* (lox/+ mlc-Cre⁺) muestra la banda de 900 pb para el alelo *wild-type* del gen de la IL-6 y una banda más grande de 1000 pb que corresponde al alelo del gen de la IL-6 floxado. La banda de 260 pb aparece cuando se da la delección del exón 2 del gen de la IL-6, sólo se observa en el músculo esquelético del ratón mL6 KO (lox/lox mlc-Cre⁺). M: músculo esquelético gastrocnemio, H: hígado, G: tejido adiposo visceral.

Se estudió mediante RT-qPCR la expresión del gen de la IL-6 en músculo esquelético (gastrocnemio), hígado y tejido adiposo (subcutáneo) (fig 4.2). Tanto en machos como en hembras se observó una disminución significativa de la expresión del mRNA de la IL-6 en el músculo de los ratones mL-6 KO; no se apreciaron diferencias significativas ni en el hígado ni en el tejido adiposo subcutáneo en ninguno de los sexos.

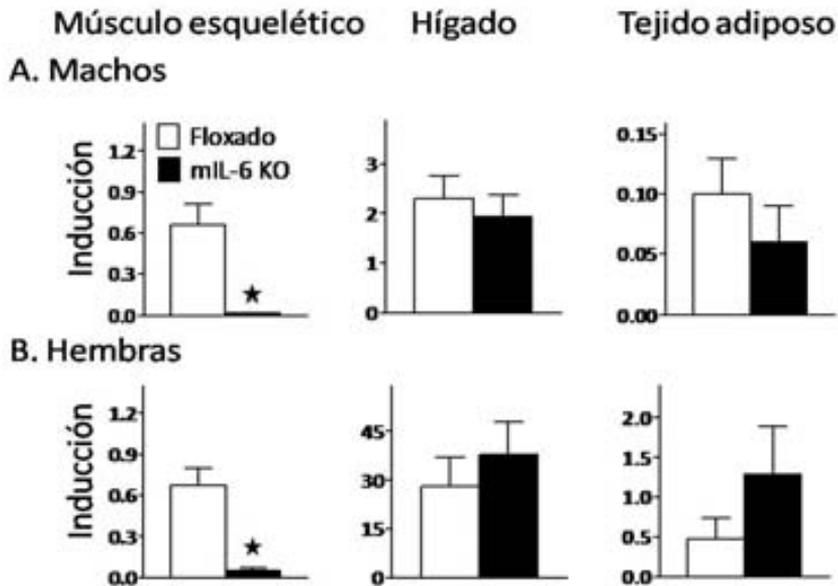


Fig 4.2: Expresión del mRNA de la IL-6 en diferentes tejidos. A. machos. B hembras. Los niveles de mRNA de la IL-6 se midieron con RT-qPCR en músculo esquelético (gastrocnemio), hígado y tejido adiposo (WAT subcutáneo). En músculo esquelético se observa una disminución significativa de los niveles de mRNA de IL-6. ★ $p < 0,05$ versus ratones floxados, $n = 3-4$.

4.1.1.3. Efecto de la deficiencia de IL-6 muscular sobre la capacidad sensorimotora

Se realizó una batería de pruebas conductuales para analizar si la deficiencia de IL-6 muscular estaba afectando a su capacidad sensorimotora. Se realizaron varios tests para valorar el equilibrio y la fuerza muscular, en los que los ratones mIL-6 KO no mostraron ninguna dificultad destacable a la hora de realizar estas pruebas (tabla 4.2).

Resultados

Tabla 4.2: Tabla de resultados de los tests sensorimotrices realizados. Se indica entre paréntesis la n. ★ $p < 0,05$ versus ratones floxados.

Test	Variable	Sexo	Genotipo	
			Floxado	KO
Barra horizontal plana	Distancia recorrida (cm)	♀	3,75 ± 2,63 (8)	6,11 ± 3,97 (9)
		♂	10,00 ± 3,54 (16)	13,12 ± 5,58 (8)
	Latencia a la caída (segundos)	♀	40,00 ± 0,00 (8)	40,00 ± 0,00 (9)
		♂	40,00 ± 0,00 (16)	40,00 ± 0,00 (8)
Barra horizontal circular	Distancia recorrida (cm)	♀	23,75 ± 10,38 (8)	15,00 ± 7,50 (9)
		♂	10,00 ± 3,54 (16)	13,12 ± 5,58 (8)
	Latencia a la caída (segundos)	♀	37,31 ± 2,69 (8)	39,54 ± 0,46 (9)
		♂	39,00 ± 0,81 (16)	33,78 ± 2,17 (8) ★
Test de habilidad prensil	Distancia recorrida (segmentos)	♀	0,00 ± 0,00 (4)	0,40 ± 7,50 (5)
		♂	0,50 ± 0,16 (16)	0,63 ± 0,263 (8)
	Latencia a la caída (segundos)	♀	10,00 ± 0,00(4)	10,00 ± 0,00 (5)
		♂	10,00 ± 0,00(16)	10,00 ± 0,00 (8)
Test de fuerza	Distancia recorrida (segmentos)	♀	9,13 ± 1,62 (8)	6,67 ± 2,19 (9)
		♂	8,44 ± 0,88 (16)	7,25 ± 1,39 (8)
	Latencia a la caída (segundos)	♀	11,48 ± 5,20 (8)	6,67 ± 2,19 (9)
		♂	8,44 ± 0,88 (16)	7,25 ± 1,39 (8)

Un grupo de machos fue sometido también al test de la barra giratoria (*rotarod test*). Los machos mIL-6 KO realizaron mejor la prueba que los ratones floxados, ya que no sólo su latencia en la barra giratoria fue mayor, sino que además sufrieron menos caídas (fig 4.3). Al comparar como realizaron la prueba en los tres días del test, después del entrenamiento, se observó que desde el primer día los ratones mIL-6 KO presentaban menos dificultades para realizar el test que los ratones floxados. Por otro lado, el aprendizaje en esta prueba fue igual en ambos genotipos (fig 4.4).

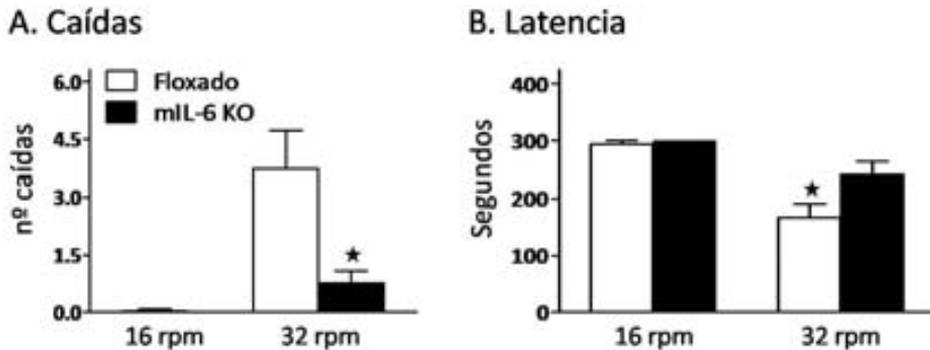


Fig 4.3: Rotarod. A. Caídas sufridas durante el tercer día de la prueba. B. Latencia en el tercer día de la prueba, tiempo que se mantenían en la barra giratoria antes de caer, n = 17-26. ★ p < 0,05 versus ratones floxados.

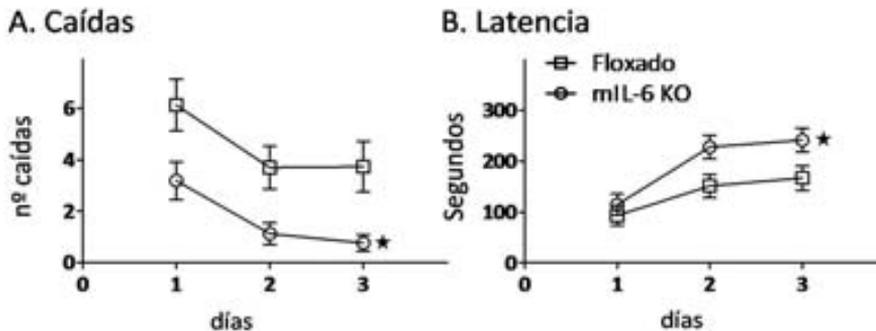


Fig 4.4: Test de Rotarod realizado a 32 rpm. A. Caídas sufridas en cada uno de los tres días en los que se hizo el test. B. Latencia en los tres días del test, tiempo que se mantenían en la barra giratoria antes de caer, n = 17-26. ★ p < 0,05 versus ratones floxados.

4.1.1.4. Resistencia a la temperatura

Para analizar si la deficiencia de IL-6 muscular afectaba al control de la temperatura se realizó un experimento de inducción de termogénesis, sometiendo a los ratones a una temperatura de 4 °C. Los datos mostraron que la deficiencia de IL-6 muscular podía afectar a la regulación de la temperatura (fig 4.5). A las 4 h de estar expuestos a 4 °C los ratones mostraron una disminución significativa de su temperatura corporal. Los machos mL-6 KO mostraron un

Resultados

mayor descenso de la temperatura que los floxados, esto se refleja en la interacción tiempo-genotipo significativa. En el caso de las hembras este descenso fue aún más espectacular (fig 4.5). Los datos de temperatura estaban reforzados por los datos de mortalidad del experimento. En el caso de las hembras murieron 4 de 14 hembras mL-6 KO versus 0 de 5 hembras floxadas. En el caso de los machos no hubo mortalidad debida a la exposición al frío.

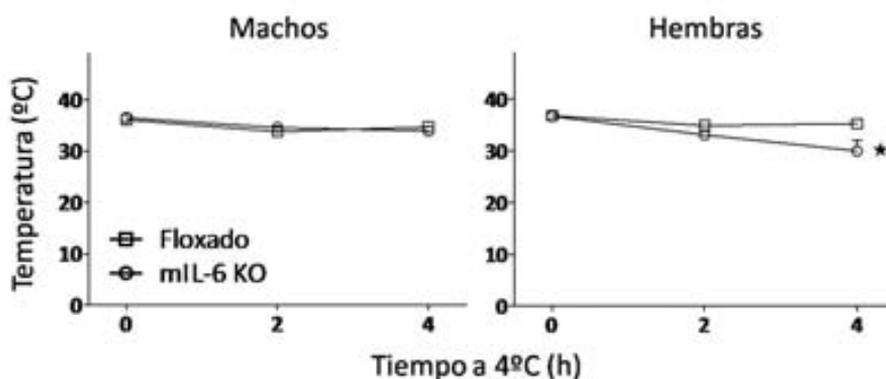


Fig 4.5: Resistencia a la temperatura. Los gráficos muestran la disminución de la temperatura corporal en machos (izquierda) y hembras (derecha), $n = 5-14$. ★ $p < 0,05$ versus ratones floxados. Tanto el tiempo como la interacción tiempo y genotipo fueron significativas ($p < 0,05$).

4.1.2. Obesidad inducida por dieta grasa

Con la finalidad de analizar el efecto de la delección de la IL-6 proveniente del músculo esquelético en el control del peso corporal y en el metabolismo, se sometió a ratones mL-6 KO a una dieta en donde la mayor parte de las calorías provenían de la grasa, en concreto el 58,4%. Como control se utilizó un grupo de animales alimentados con una dieta estándar en la que el aporte de calorías de la grasa de la dieta era del 18%.

Este experimento se realizó en dos ocasiones. La primera vez se compararon los

ratones mIL-6 KO con ratones *wild-type*. Dado que éste no resultaba ser el mejor control se optó por repetir el experimento, en esta segunda ocasión se compararon con los animales floxados. Por criterios de espacio y tiempo en el primer experimento se realizó el test de tolerancia a la insulina y el test de tolerancia a la glucosa oral y en el segundo experimento se realizaron pruebas de conducta.

4.1.2.1. Evolución del peso

Tanto en el primer como en el segundo experimento, los ratones alimentados con dieta grasa desarrollaron obesidad. En el primer experimento, aunque se pesaron los ratones heterocigotos y se presentan los datos en el gráfico no se incluyeron en el análisis estadístico. Se consideró más adecuada esta estrategia de análisis debido a que a estos animales no se les realizó algunas pruebas como la OGTT que podrían afectar al peso corporal. En este primer experimento los machos presentan interacción dieta, genotipo y tiempo significativa ($p < 0,001$ en el peso absoluto; $p = 0,001$ en la ganancia de peso) y sus descomposiciones nos indicaron que los mIL-6 KO presentaron resistencia a la obesidad, engordando menos que los ratones *wild-type*, aunque la diferencia no llegó a ser significativa en el caso del peso absoluto (fig 4.6), pero sí en la ganancia de peso, aunque sólo en los alimentados con dieta grasa (fig 4.7). En las hembras, tanto en el peso absoluto como en la ganancia de peso, sólo se pudo observar el efecto de la dieta grasa, pero no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos (fig 4.6 y 4.7).

Resultados

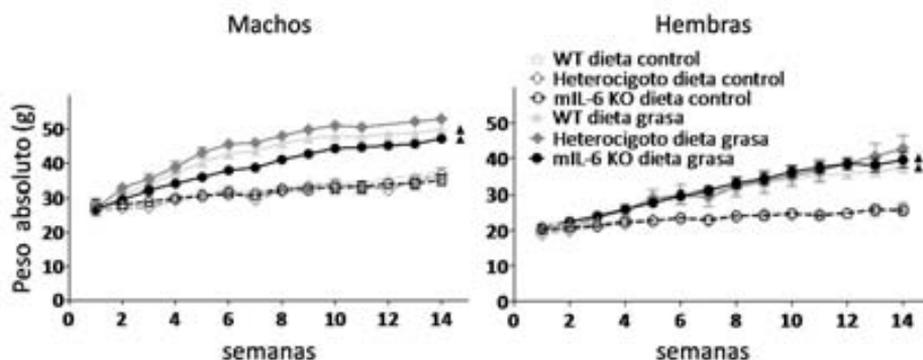


Fig 4.6: Peso absoluto de los ratones del primer experimento. Se muestra el efecto de la dieta grasa en machos y en hembras, $n = 7-22$. El tiempo, así como las interacciones tiempo, dieta y genotipo, tiempo y dieta y tiempo y genotipo fueron significativas ($p < 0,05$) en ambos sexos. ▲ $p < 0,05$ versus dieta control.

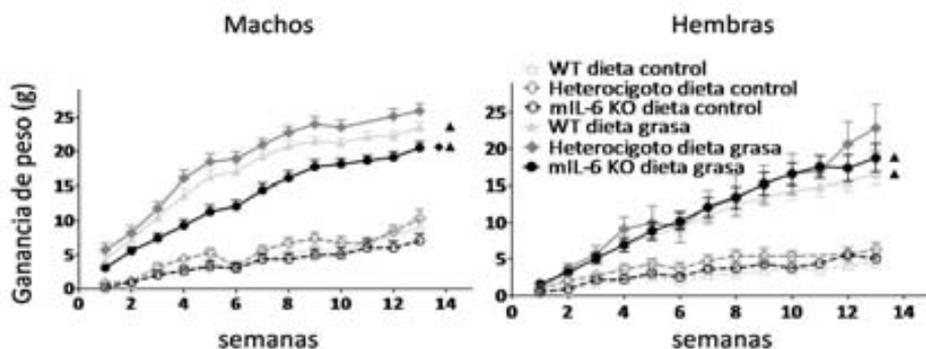


Fig 4.7: Ganancia de peso de los ratones del primer experimento. Se muestra el efecto de la dieta en machos y hembras, $n = 7-22$. El tiempo, así como las interacciones tiempo, dieta y genotipo, tiempo y dieta y tiempo y genotipo fueron significativas ($p < 0,05$) en ambos sexos. ▲ y ◆ $p < 0,05$ versus dieta control y ratones *wild-type* en dieta grasa, respectivamente.

El segundo experimento confirmó lo obtenido en el primero. Los machos mL-6 KO volvieron a desarrollar resistencia a la obesidad. En el análisis del peso absoluto no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos (fig 4.8), pero si se observaron en la ganancia de peso donde los ratones mL-6 KO engordaban significativamente menos que los otros tres genotipos (fig 4.9). Cuando se realiza el análisis estadístico comparando únicamente los ratones mL-

6 KO con los floxados, el resultado es claramente significativo tanto en el peso absoluto como en la ganancia de peso. Por lo que se refiere a las hembras, al igual que en el experimento anterior, éstas se comportaron igual que las hembras *wild-type*, además el análisis estadístico mostró que las hembras *wild-type* y las mL-6 KO engordaban significativamente más que las floxadas (fig 4.8 y 4.9).

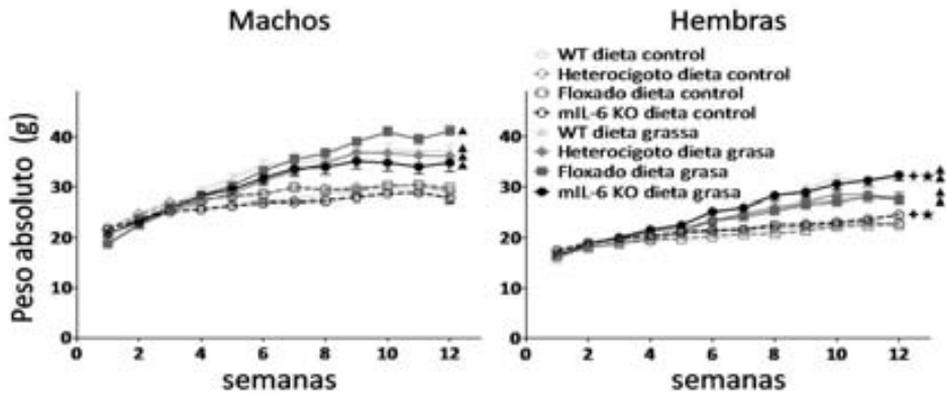


Fig 4.8: Peso absoluto de los ratones del segundo experimento. Se muestra el efecto de la dieta en machos y en hembras, n=9-19. El tiempo, así como las interacciones tiempo, dieta y genotipo, tiempo y dieta y tiempo y genotipo fueron significativas ($p < 0,05$) en ambos sexos. \blacktriangle , \blackplus y \blackstar $p < 0,05$ versus dieta control y ratones heterocigotos y floxados, respectivamente.

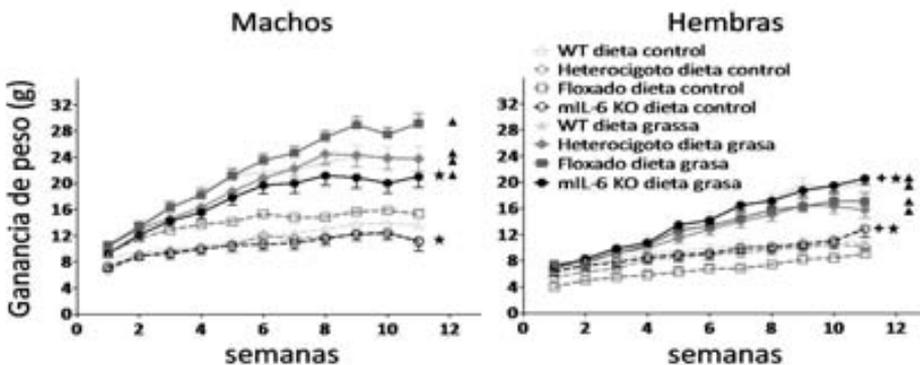


Fig 4.9: Ganancia de peso de los ratones del segundo experimento. Se muestra el efecto de la dieta en machos y hembras, n= 9-19. El tiempo, así como las interacciones tiempo, dieta y genotipo, tiempo y dieta y tiempo y genotipo fueron significativas ($p < 0,05$) en ambos sexos. \blacktriangle , \blackplus y \blackstar $p < 0,05$ versus dieta control y ratones heterocigotos y floxados, respectivamente. En relación al genotipo sólo se muestran las diferencias significativas de los ratones mL-6 KO respecto a los demás.

Resultados

4.1.2.2. Seguimiento de la ingesta

En ambos experimentos se hizo seguimiento de la ingesta. En el primero de ellos la dieta produjo una disminución de la ingesta en los ratones alimentados en dieta grasa que únicamente fue significativa en los machos (fig 4.10.a). Al analizar las calorías consumidas se observó un aumento significativo en los animales alimentados con dieta grasa de ambos sexos (fig 4.10.b). No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes genotipos ni en la ingesta en gramos ni en las calorías consumidas (fig 4.10).

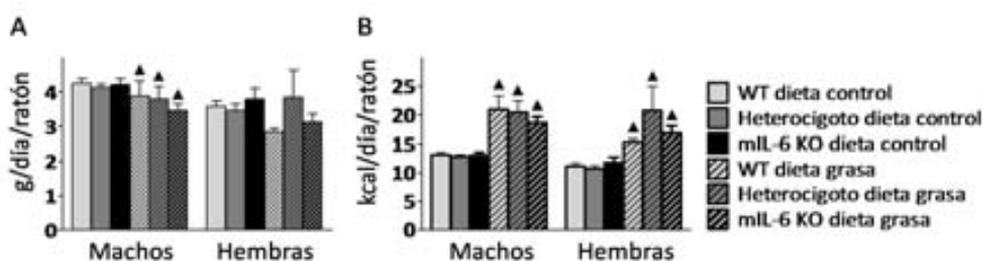


Fig 4.10: Ingesta del primer experimento. A. Valores de la ingesta en gramos por animal y día. B. Kcal consumidas por animal y día, n= 2-8. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

En el segundo experimento se corroboraron los datos obtenidos en el primero. El análisis de la ingesta mostró una disminución de ésta en los animales alimentados con dieta grasa de ambos sexos (fig 4.11a), y al igual que en el anterior experimento los ratones alimentados con dieta grasa, todos ingerir una cantidad inferior de comida, estaban comiendo una mayor cantidad de calorías (fig 4.11b). Como en la anterior ocasión no se detectó en ninguno de los dos análisis efecto del genotipo (fig 4.11).

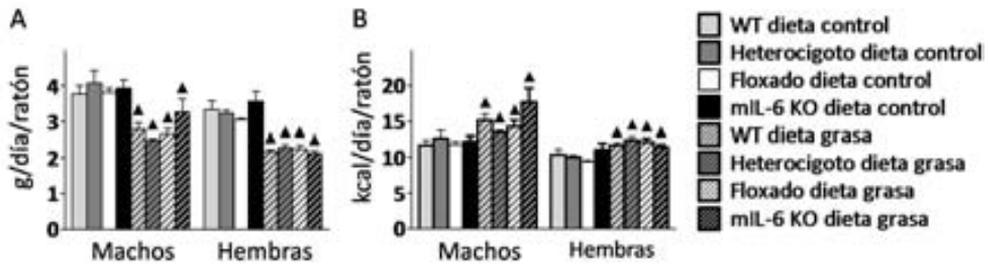


Fig 4.11: Ingesta en el segundo experimento. A. Valores de la ingesta en gramos por animal y día. B. Kcal consumidas por animal y día, n= 3-6. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

En el segundo experimento se analizó la eficiencia alimentaria usando la ratio ganancia de peso/kcal consumidas. Este análisis mostró que en los machos la dieta grasa tenía una eficiencia mayor que la dieta control. La deficiencia de IL-6 muscular sólo fue significativa en los machos donde produjo una disminución de la eficiencia alimentaria respecto a los floxados (fig 4.12). En las hembras la interacción dieta y genotipo fue significativa (p = 0,023), su descomposición únicamente mostró un aumento con la dieta grasa (fig 4.12).

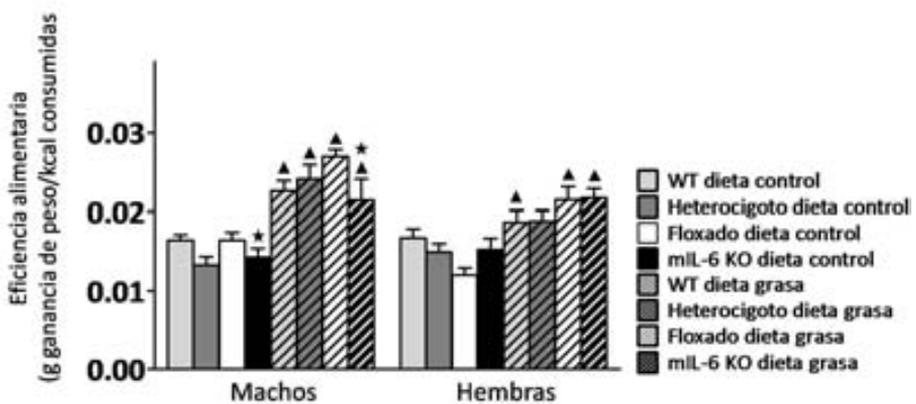


Fig 4.12: Eficiencia alimentaria. En machos y en hembras se muestran los valores de la eficiencia alimentaria durante la dieta, n = 10-19. ▲ y ★ p < 0,05 versus grupo correspondiente de dieta control y ratones floxados.

Resultados

4.1.2.3. Tejidos

4.1.2.3.1. Peso de los tejidos

Una vez eutanasiados los ratones, se les extrajeron el tejido adiposo visceral, el tejido adiposo subcutáneo, el tejido adiposo marrón (BAT) y el hígado y se pesaron (fig4.13, 4.14, 4.15 y 4.16).

En ambos experimentos, tal y como se esperaba, los ratones alimentados con dieta grasa tenían más cantidad de tejido adiposo que los alimentados con dieta control independientemente del sexo. En el primer experimento, dado el volumen de muestras y animales con los que se trabajaba se decidió no tomar muestras de los ratones heterocigotos por lo que no se tienen datos del peso de los tejidos ni de otros parámetros analizados. En este experimento, sólo se vio efecto de la deficiencia de IL-6 muscular en el tejido visceral de los machos alimentados con dieta grasa; la interacción dieta y genotipo significativa ($p = 0,017$) y su descomposición, mostró un aumento del peso de este tejido en los machos mL-6 KO únicamente cuando se alimentaron con la dieta grasa (fig 4.13 y 4.12). Por otro lado, la dieta grasa causó un aumento del peso absoluto de hígado, que no se vio en el peso relativo, donde los machos no presentaron diferencias y en las hembras disminuyó. Por lo que se refiere a la deficiencia de IL-6 muscular ésta no afectó ni al peso absoluto ni al relativo de este tejido en ninguno de los sexos (fig 4.13 y 4.12).

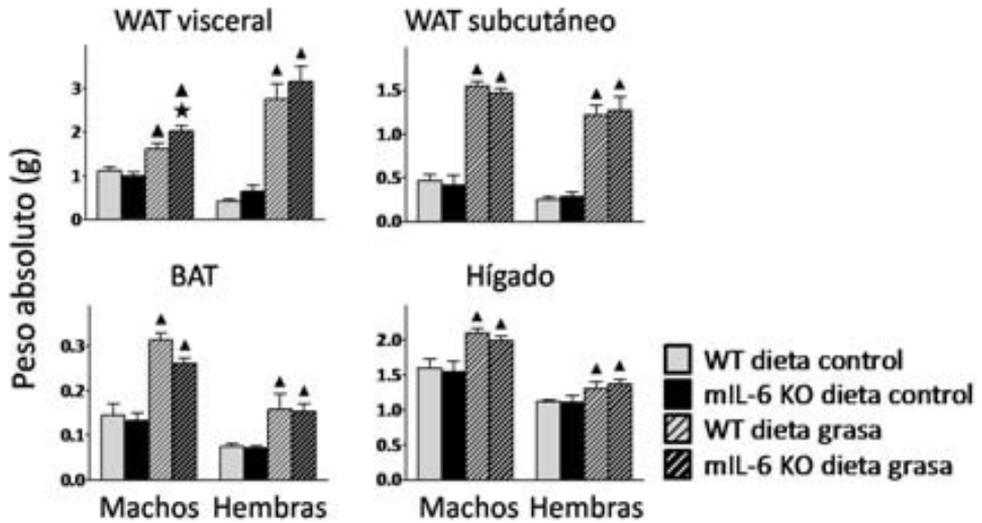


Fig 4.13: Peso absoluto de los tejidos del primer experimento, n = 13-21. ▲ y ★ p < 0,05 versus los controles correspondientes.

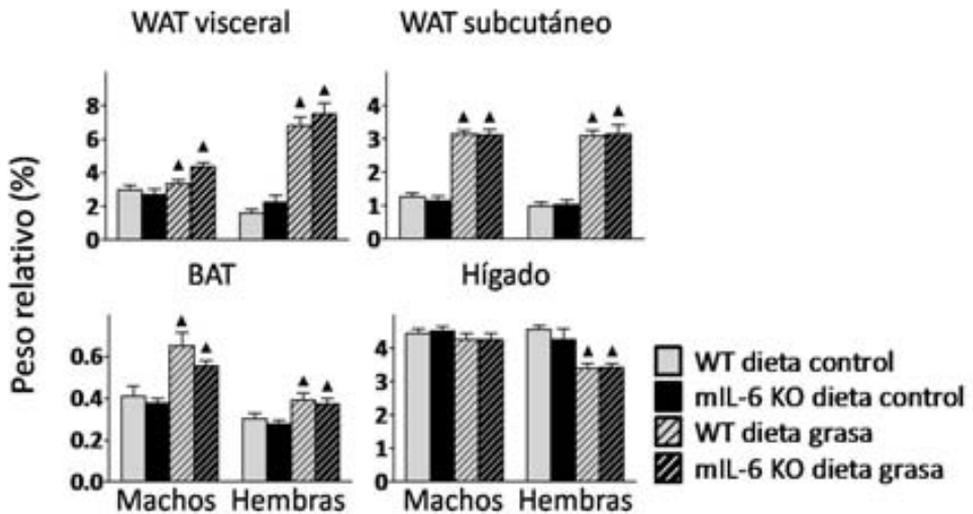


Fig 4.14: Peso relativo de los tejidos del primer experimento, n = 13-21. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

En el segundo experimento, en general se observó un efecto sexo dependiente de la deficiencia de IL-6 en el peso de estos tejidos, así mientras en las hembras mL-6 KO los depósitos de grasa pesaron más que en las hembras

Resultados

floxadas, en los machos se observó lo contrario (fig 4.15 y 4.16). En el tejido adiposo visceral de las hembras, en el peso absoluto de éste, la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,028$), cuando se hizo la descomposición el efecto de la dieta fue significativo, pero en el caso del genotipo éste mostró en las *mIL-6 KO* y en las *wild-type* un aumento del peso del tejido significativo respecto a las heterocigotas cuando eran alimentadas con la dieta grasa (fig 4.15). y lo mismo se observó en el peso relativo (fig 4.16). En el caso de los machos la dieta grasa aumentó significativamente el peso absoluto y el relativo del tejido adiposo visceral (fig 4.15 y 4.16), además en el peso absoluto de este tejido los ratones *mIL-6 KO* presentaron una disminución significativa de éste respecto a los floxados independientemente de la dieta con la que fueron alimentados (fig 4.15). Por lo que se refiere al tejido adiposo subcutáneo, en las hembras la interacción entre la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,034$) en el peso absoluto y su descomposición mostró un aumento significativo de la dieta grasa en los cuatro genotipos y una aumento significativo del peso de este tejido en las *mIL-6 KO* respecto a las floxadas con la dieta grasa (fig 4.15). El peso relativo del tejido adiposo subcutáneo aumentó significativamente con la dieta grasa. También se dio el efecto del genotipo observándose un aumento significativo en las *mIL-6 KO* respecto a las floxadas y a las heterocigotas (fig 4.16). Con relación a los machos, en éste tejido la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa tanto en el peso absoluto ($p = 0,011$) como en el relativo ($p = 0,013$). En ambos casos su descomposición mostró un aumento significativo con la dieta grasa en todos los genotipos y en los ratones alimentados con dieta grasa mostró un descenso significativo del peso absoluto, así como del relativo, en los *mIL-6 KO* (fig 4.16).

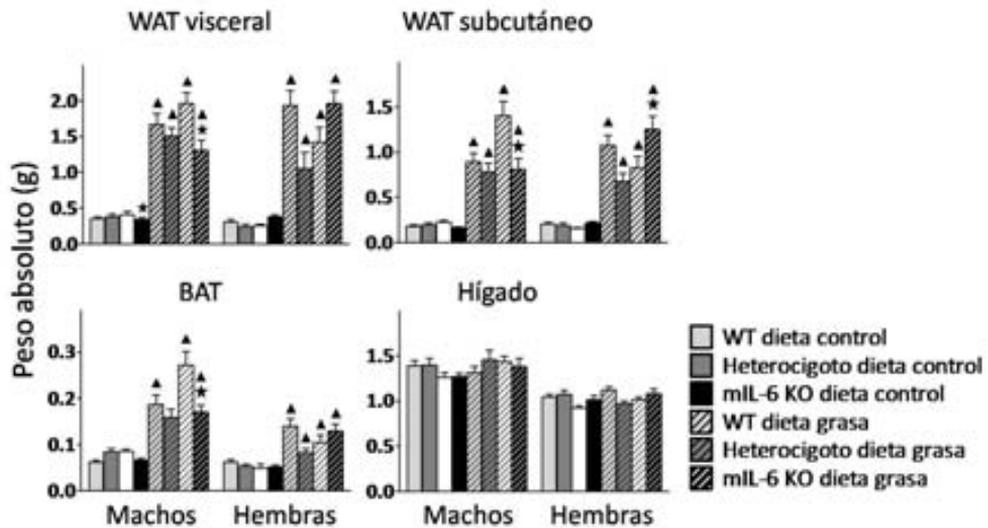


Fig 4.15: Peso absoluto de los tejidos en el segundo experimento, n = 9-19. ▲ y ★ p < 0,05 versus sus respectivos controles. Con respecto al genotipo sólo se muestran las diferencias significativas de los ratones mL-6 KO con su control, los ratones floxados.

El peso absoluto y relativo del BAT aumentó significativamente con la dieta grasa en ambos sexos (fig 4.15 y 4.16). Mientras que en la hembras no hubo diferencias entre genotipos, en los machos la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa tanto en el peso absoluto ($p = 0,018$), como en el relativo ($p = 0,049$). En ambos casos al descomponer la interacción el aumento por efecto de la dieta grasa fue significativo en todos los genotipos excepto en los ratones heterocigotos. Además, los ratones mL-6 KO alimentados con dieta grasa presentaron un menor peso absoluto y relativo que los floxados. (fig 4.15 y 4.16).

Resultados

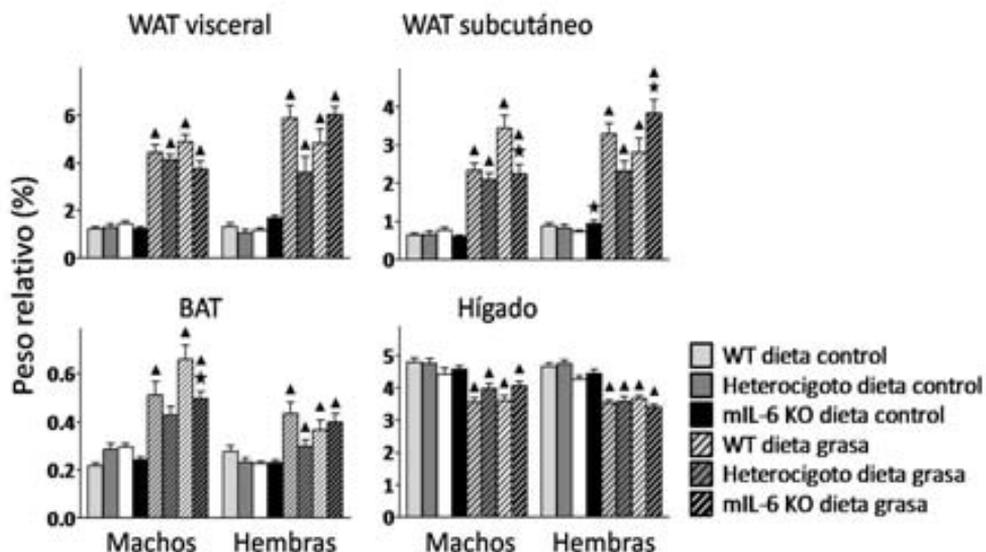


Fig 4.16: Peso relativo de los tejidos en el segundo experimento, n = 9-19. ▲, y ★ p < 0,05 versus sus respectivos controles. Con respecto al genotipo sólo se muestran las diferencias significativas de los ratones mL-6 KO con su control, los ratones floxados.

En el caso del peso absoluto del hígado en este segundo experimento no se observó el aumento debido a la dieta grasa que se dio en el primero (fig 4.15). A diferencia del primer experimento, el análisis del peso relativo de los machos mostró una disminución significativa con la dieta grasa (fig 4.16). Por otro lado, en el peso relativo del hígado de las hembras la interacción dieta y genotipo fue significativa ($p = 0,032$), su descomposición mostró un aumento significativo de la dieta grasa y a nivel del genotipo, en dieta control mostró una disminución significativa en las floxadas respecto a las *wild-type* y heterocigotas.

4.1.2.3.2. Análisis de los adipocitos

Para saber cuáles eran las causas de los cambios en los depósitos de grasa se analizaron el número y tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo visceral y en el tejido adiposo subcutáneo en ambos experimentos.

Resultados

En el primer experimento se analizaron los adipocitos de los ratones *wild-type* y de los *mIL-6 KO*. En el tejido adiposo visceral los ratones de ambos sexos alimentados con dieta grasa presentaron adipocitos de mayor tamaño (fig 4.17a). Por otro lado, en el tejido adiposo subcutáneo, en los machos el efecto de la dieta aumentó significativamente el tamaño de estas células. Esto también se observó en las hembras al descomponer la interacción significativa de la dieta y el genotipo ($p=0,025$) además de un menor aumento debido a la deficiencia de IL-6 en las alimentadas con dieta grasa (fig 4.17b). También se analizó el número de adipocitos que se vio disminuido por la dieta grasa en los machos en el tejido adiposo visceral y en el subcutáneo y en las hembras en el subcutáneo. Por otro lado, la deficiencia de IL-6 muscular tuvo un efecto sexo dependiente en el tejido adiposo visceral ya que los machos presentaron un mayor número de adipocitos, mientras que en las hembras no hubo diferencias.

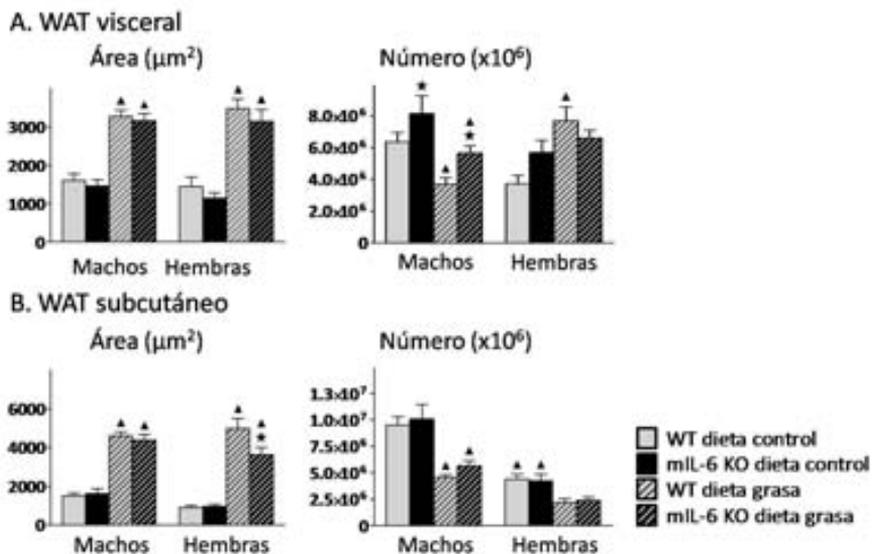


Fig 4.17: Tamaño y número de adipocitos del primer experimento. A. en el tejido adiposo visceral, $n=8-10$. **B.** en el tejido adiposo subcutáneo, $n=10$. \blacktriangle y \star $p < 0,05$ versus los correspondientes controles.

En el segundo experimento se analizaron los ratones floxados y los *mIL-6 KO*.

Resultados

En esta ocasión, en el tejido adiposo visceral en el tamaño de los adipocitos de los machos la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,001$), su descomposición mostró un aumento significativo con la dieta grasa, y efecto de la deficiencia de IL-6 muscular únicamente en los ratones alimentados con dieta grasa, en los que produjo un menor aumento del tamaño de éstos. En el número de adipocitos no se observaron diferencias entre estos animales (fig 4.18). En cuanto a las hembras, el tamaño de los adipocitos aumentó y el número disminuyó significativamente con la dieta grasa (fig 4.18).

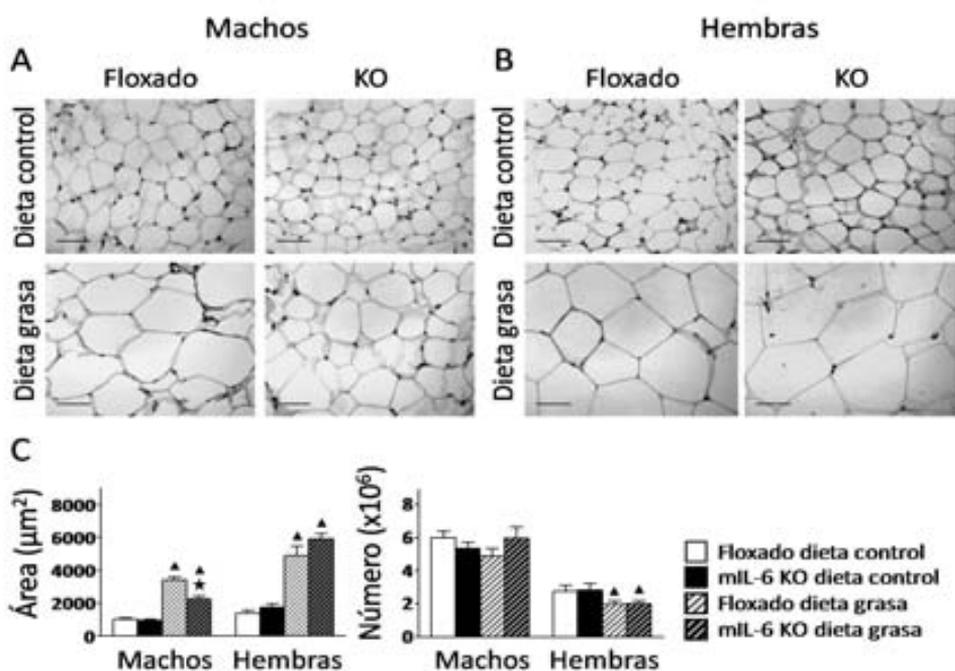


Fig 4.18: Tamaño y número de adipocitos del tejido adiposo visceral del segundo experimento. Tinción de hematoxilina y eosina del tejido adiposo visceral (A) en machos y (B) en hembras; barra de escala: 50 µm. C. Tamaño y número de adipocitos del tejido visceral, n = 10-19. ▲ y ★ $p < 0,05$ versus sus controles respectivos.

En el tejido adiposo subcutáneo la dieta grasa aumentó significativamente el tamaño de los adipocitos en ambos sexos. Así mismo, se dio un efecto de la

deficiencia de IL-6 muscular dependiente del sexo; en los machos el tamaño de los adipocitos de los ratones mL-6 KO era más pequeño que el de los floxados en ambas dietas, mientras que en las hembras se observó lo contrario (fig 4.19). En relación con el número de adipocitos no se observaron diferencias en ninguno de los sexos (fig 4.19).

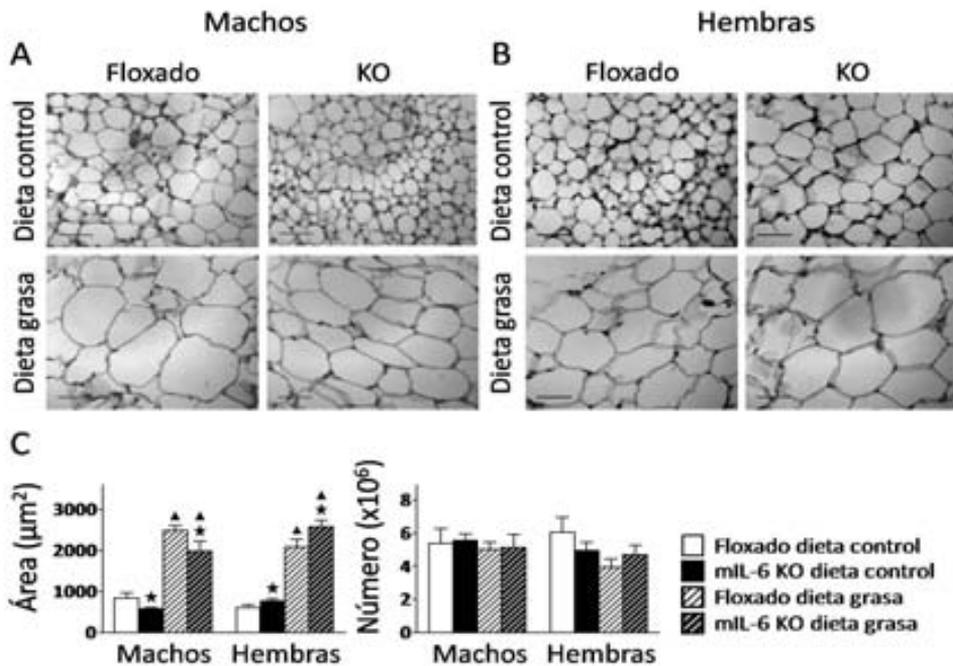


Fig 4.19: Tamaño y número de adipocitos del tejido adiposo subcutáneo del segundo experimento. Tinción de hematoxilina y eosina del tejido adiposo subcutáneo (A) en machos y (B) en hembras; barra de escala: 50 µm (40x). C. Tamaño y número de adipocitos del tejido subcutáneo, n = 10-19. ▲ y ★ p < 0,05 versus dieta control y ratones floxados, respectivamente.

4.1.2.3.3. Esteatosis hepática

La esteatosis hepática también se analizó en ambos experimentos. En el primer experimento, donde se analizaron los ratones *wild-type* y los mL-6 KO, la dieta la aumentó significativamente en los machos (fig 4.20). En las hembras la interacción dieta y genotipo fue significativa (p = 0,011) y su descomposición

Resultados

indicó que el efecto de la dieta grasa únicamente era significativo en las *wild-type*, mientras que la deficiencia de IL.6 muscular incrementó la esteatosis en las hembras con dieta control pero no con dieta grasa (fig 4.20).

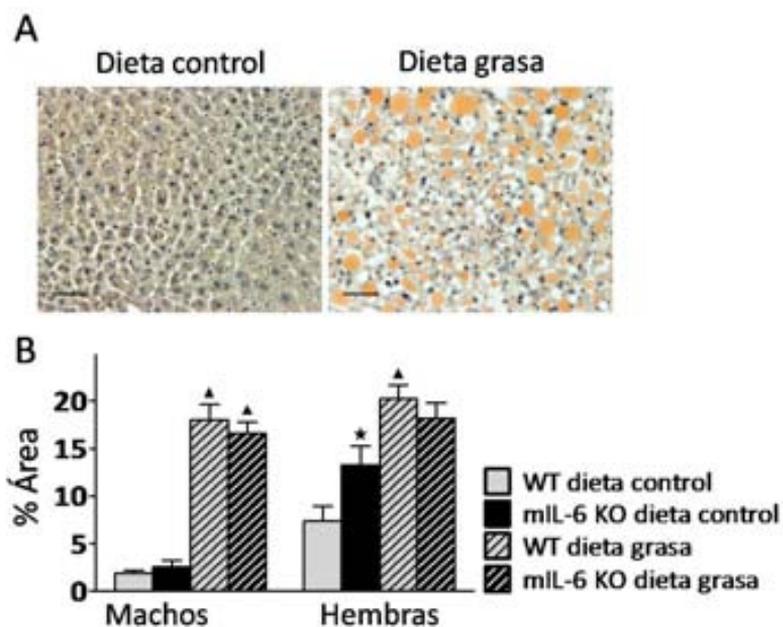


Fig 4.20: Esteatosis hepática en el primer experimento. A. Tinción de aceite de rojo O en criosecciones de hígado, barra de escala: 50 μ m. B. Porcentaje de área teñida, n = 5-7. \blacktriangle y \star p < 0,05 versus sus controles respectivos.

En el segundo experimento se analizaron los ratones floxados y los mL-6 KO. Aunque los ratones alimentados con dieta grasa no mostraron un aumento en el peso absoluto del hígado, sí se observó un aumento en la acumulación de lípidos en este tejido con respecto a los animales alimentados con dieta control (fig 4.21). Este aumento se vio tanto en los machos como en las hembras. No se observó ningún efecto significativo de la deficiencia de IL-6 muscular en las hembras, en cambio en los machos produjo una disminución en la acumulación de lípidos en el hígado tanto en ratones alimentados con dieta control como en los alimentados con dieta grasa.

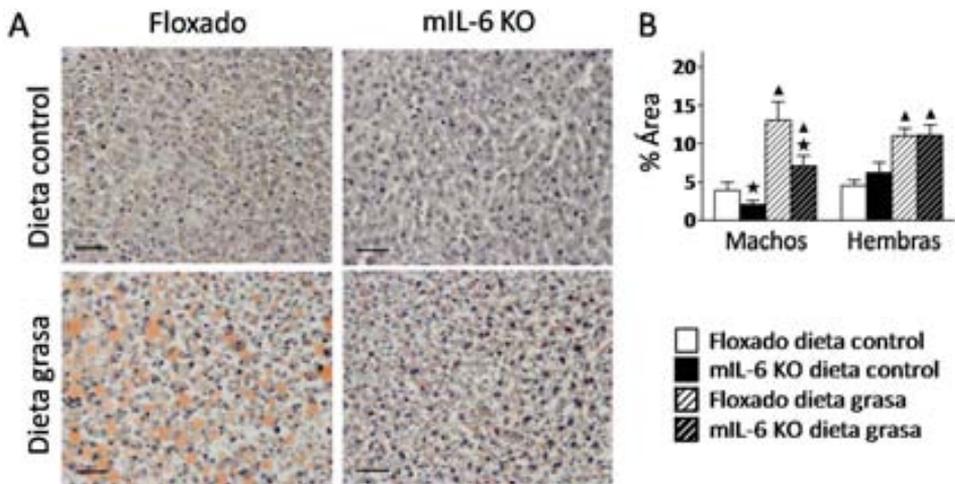


Fig 4.21: Esteatosis hepática. A. Tinción de aceite de rojo O en criosecciones de hígado de machos, barra de escala: 50 μm (20x). B. Porcentaje de área teñida, n = 9-19. \blacktriangle y \star p < 0,05 versus dieta control y ratones floxados, respectivamente.

4.1.2.3.4. Tibia y músculo tibialis

En el primer experimento, con la intención de estudiar el efecto de la deficiencia de IL-6 muscular en el crecimiento de estos animales se midió la longitud de la tibia en ratones *wild-type* y mL-6 KO de ambos sexos, que no mostró diferencias significativas (fig 4.22). También se pesó el músculo tibialis que aumentó con la dieta grasa, aunque en las hembras no llegó a ser significativo (p = 0,051). Al calcular el peso relativo (respecto al peso corporal) se observó una disminución en las hembras alimentadas con dieta grasa (fig 4.22). Por otro lado al normalizar el peso del tibialis con la longitud de la tibia el aumento con la dieta grasa fue significativo en ambos sexos (fig 4.22).

Resultados

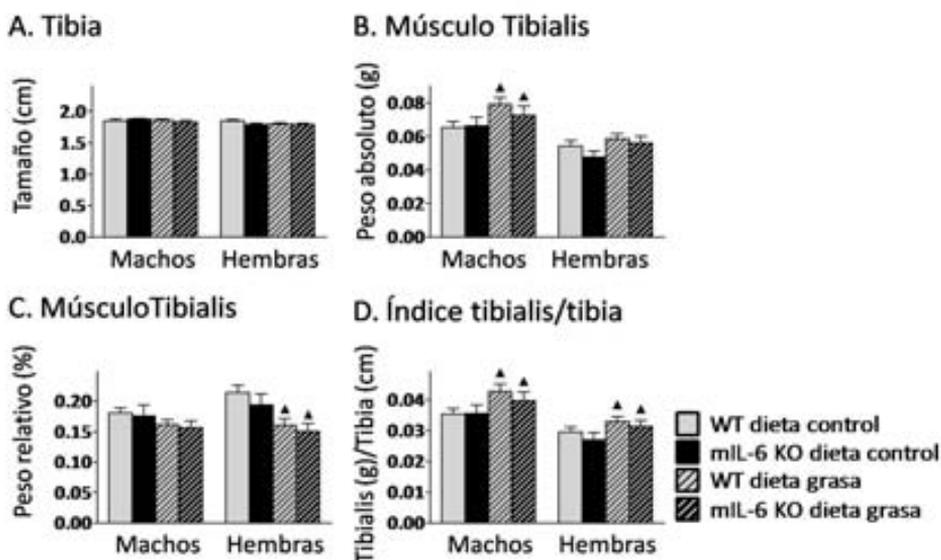


Fig 4.22: Crecimiento. A. Longitud de la tibia. B. Peso absoluto del músculo tibialis. C. Peso relativo del músculo tibialis. D. Peso del músculo tibialis normalizado por la longitud de la tibia, n = 6 -17. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

4.1.2.4. Test de *hole-board*

En el segundo experimento, hacia el final de la dieta se sometió a los ratones floxados y a los mL-6 KO al test de *hole board* (o test de la tabla de agujeros). En general, tras descomponer las interacciones dieta y genotipo significativas que dio en la actividad horizontal (p = 0,026 en machos y p = 0,004 en hembras), y en la actividad vertical (p = 0,001 en machos y p = 0,043 en hembras) se observó que los machos mL-6 KO alimentados con dieta control tenían una mayor actividad: realizaron más *rearings* (ponerse en pie sobre las patas traseras para explorar su entorno) y deambularon más. En las hembras se observó la tendencia opuesta (fig 4.23). En el caso de los machos, la deficiencia de IL-6 muscular tuvo un efecto significativo aumentando la actividad exploratoria (tiempo y número de veces que introdujeron la cabeza en los agujeros (*head-dipping*)). En los ratones alimentados con dieta grasa este comportamiento se vio alterado en la mayoría

de los parámetros analizados. Únicamente en el caso del número y tiempo de *head-dipping* realizados por los machos se observó la misma tendencia que con la dieta control e incluso se vio incrementada (fig 4.23). Por el contrario, la actividad vertical disminuyó únicamente en los machos mL-6 KO y en las hembras no se observaron diferencias (fig 4.23). Además las hembras mL-6 KO presentaron un aumento de la actividad horizontal con la dieta grasa (fig 4.23).

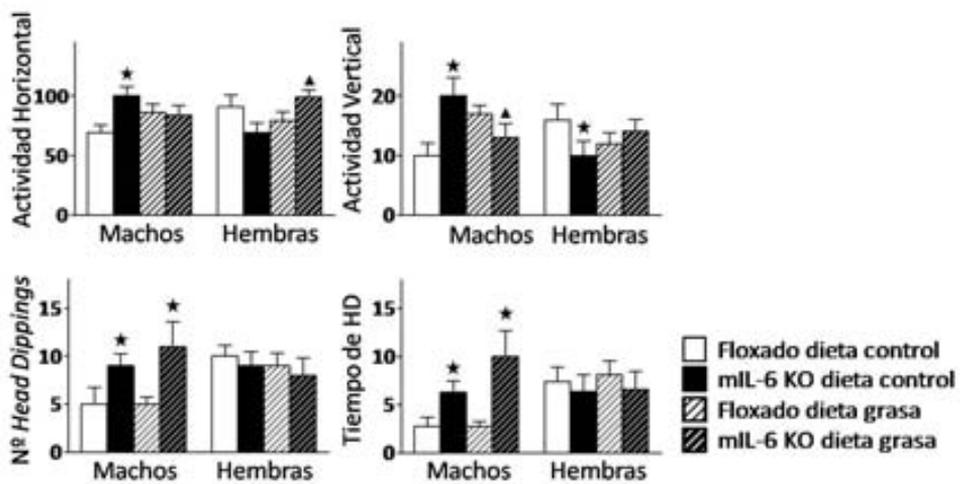


Fig 4.23: Test de *Hole-board*. Datos de comportamiento durante el test, n = 9-19. ▲ y ★ p < 0,05 versus los controles correspondientes.

4.1.2.5. Determinación de la glucemia

En el primer experimento se hizo el seguimiento de los niveles de glucemia, tanto en el destete como durante la dieta. Los ratones no presentaron diferencias significativas debidas a la deficiencia de IL-6 muscular en los niveles de glucosa en el destete (fig 4.24).

Resultados

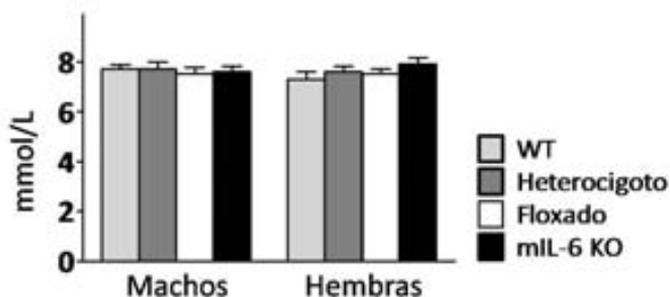


Fig 4.24: Glucosa circulante: Niveles de glucosa en el destete, n = 26-44.

Durante el primer experimento se compararon los animales mL-6 KO con animales *wild-type* de la misma camada. Se midieron los niveles de glucosa circulante al inicio y a la semana 2, 6 y 10 de dieta. A partir de la semana 2 de dieta se observó un aumento significativo de la glucemia en los ratones alimentados con dieta grasa, tanto en machos como en hembras. La deficiencia de IL-6 muscular no tuvo ningún efecto destacable en las diferentes medidas en ninguno de los sexos ni dietas, excepto en la semana 2 en los machos la descomposición de la interacción de la dieta y el genotipo ($p = 0,002$) mostró que el aumento de la glucemia con la dieta grasa sólo fue significativo en los ratones *wild-type* (fig 4.25).

También se midió la glucemia después de un ayuno de 18h a las 11 semanas de dieta. La glucemia disminuyó claramente por el ayuno pero se mantuvieron las diferencias entre las dietas (fig 4.25).

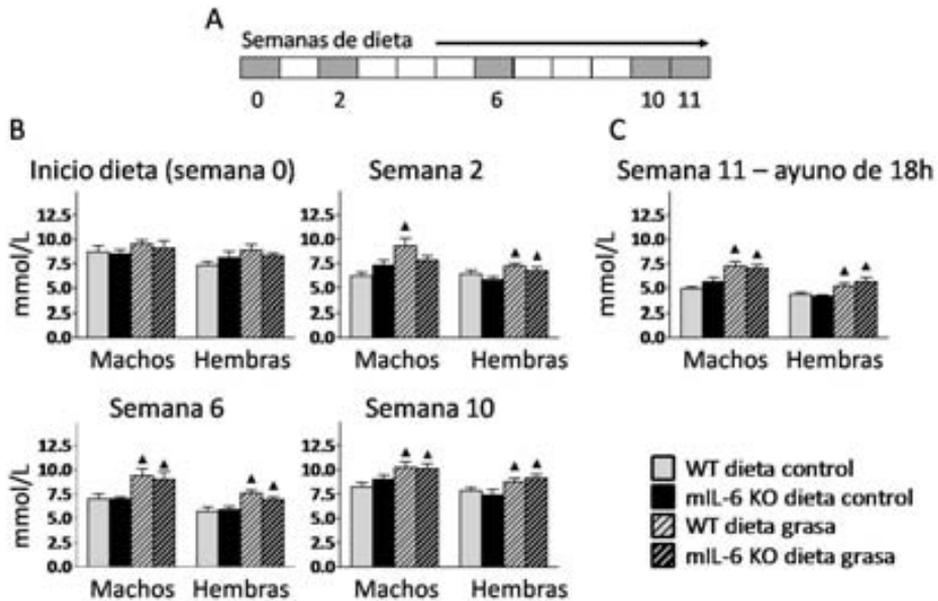


Fig 4.25: Niveles de glucosa circulante. A. Cronograma de las medidas de glucosa realizadas a lo largo del experimento. B. Valores obtenidos a diferentes tiempos, n = 10-19. C. Glucemia tras un ayuno de 18h, n = 9-19. ▲ p < 0,05 versus control correspondiente.

En el segundo experimento se compararon animales floxados con los ratones mIL-6 KO alimentados con dieta control. En esta ocasión se midió en un grupo de animales de unos 4 meses de edad y también después de un ayuno de 18h (fig 4.26). No se observaron diferencias significativas entre los genotipos en los niveles de glucemia en ninguna de las dos situaciones, aunque sí se observó una disminución de la glucemia en ambos sexos, tras el ayuno.

Resultados

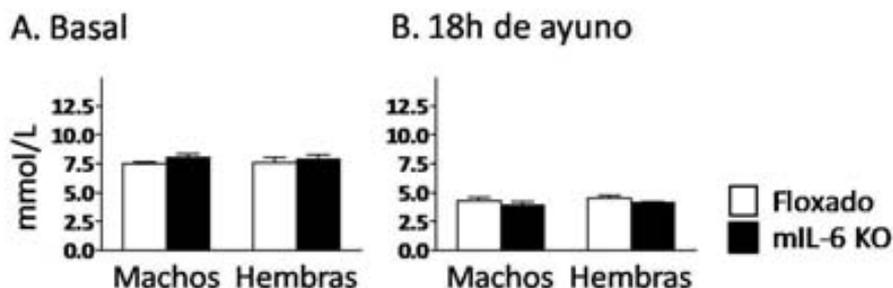


Fig 4.26: Niveles de glucosa circulante en floxados y mL-6 KO en dieta control. A. Valores de glucosa circulante a los 4 meses de edad. B. Valores de glucosa circulante después de un ayuno de 18h.

4.1.2.6. Test de tolerancia a la Insulina (ITT)

En el primer experimento se realizó el test de tolerancia a la insulina (ITT) en el que se compararon animales mL-6 KO con hermanos de camada *wild-type*. Tal y como se esperaba los animales alimentados con dieta grasa desarrollaron intolerancia a la insulina (fig 4.27), un efecto más notable en machos que en hembras. Se observó que los machos mL-6 KO alimentados con dieta grasa tendían a ser más sensibles a la insulina que los ratones *wild-type* alimentados con la misma dieta, pero esta diferencia no llegó a ser significativa.

También se comparó los ratones mL-6 KO alimentados con dieta control con ratones floxados alimentados con la misma dieta. Al igual que pasaba al compararlos con los ratones *wild-type*, los datos no mostraron ninguna diferencia estadística (fig 4.27).

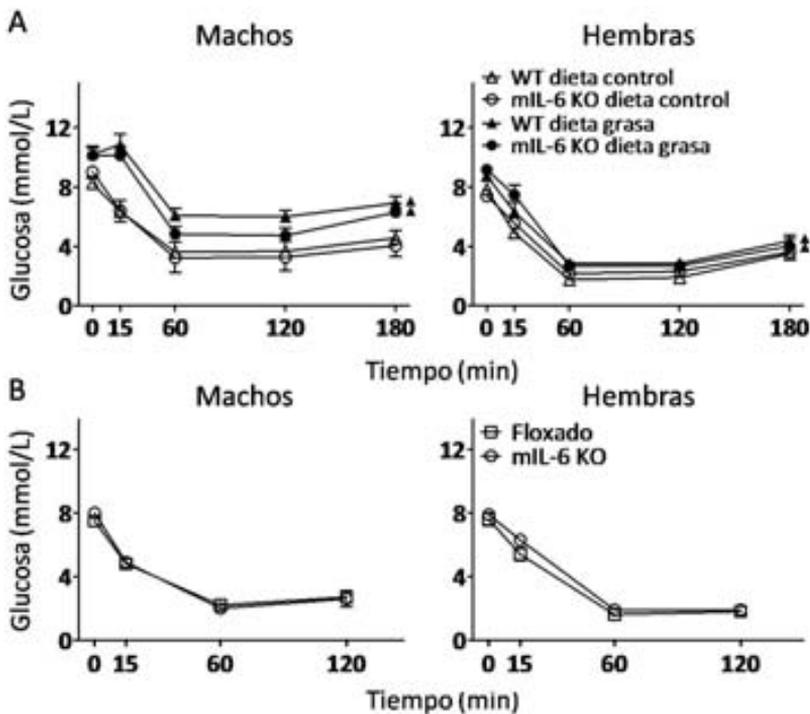


Fig 4.27: Test de tolerancia a la insulina. Se inyectó intraperitonealmente 1,5 U de insulina por kg de ratón **A**. ITT realizada en el primer experimento, comparando *wild-type* y mIL-6KO, n = 9-17, el efecto del tiempo fue significativo en ambos sexos, y en el caso de los machos también fue significativa la interacción tiempo y dieta. **B**. ITT comparando mIL-6 KO con floxados, n = 5 – 14, el efecto del tiempo fue significativo en ambos sexos. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

4.1.2.7. Test de tolerancia a la glucosa oral (OGTT)

En el test de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) realizado en el primer experimento, como en el caso de la ITT, se compararon ratones mIL-6 KO con ratones *wild-type*. Los ratones alimentados con dieta grasa, tanto machos como hembras, eran intolerantes a la glucosa (fig 4.28). La deficiencia de IL-6 muscular en machos mostró un ligera tendencia a revertir el fenotipo que no llegó a ser estadísticamente significativa (p = 0,080). Tampoco se observaron diferencias significativas entre genotipos en los ratones alimentados con dieta control (fig 4.28).

Resultados

Se realizó la OGTT a un grupo de ratones mL-6 KO y floxados de entre 13 y 14 semanas de vida, respectivamente. La deficiencia de IL-6 no mostró ningún efecto en este test.

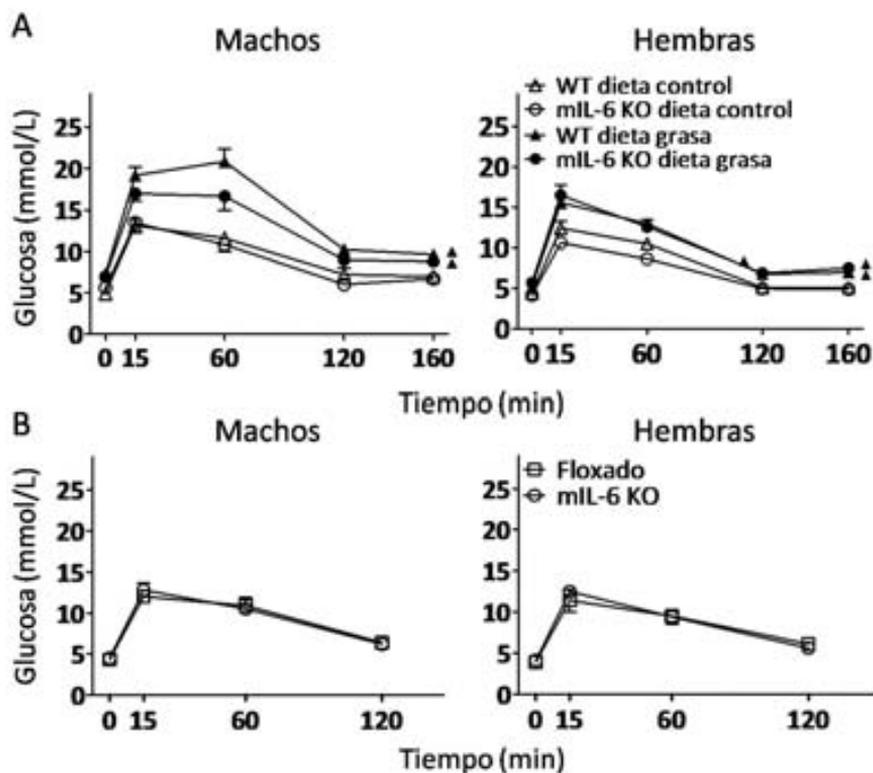


Fig 4.28: Test de tolerancia a la glucosa oral. Tras un ayuno de 18h se administró oralmente 2 g de glucosa por kg de ratón A. OGTT realizada en el primer experimento, comparando *wild-type* y mL-6KO, n = 9-17, tanto el tiempo como la interacción tiempo dieta fue significativa en ambos sexos B. OGTT comparando mL-6 KO con floxados, n = 3 – 14, el efecto del tiempo fue significativo en ambos sexos. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

4.1.2.8. Glucógeno hepático

En las muestras de hígado obtenidas en el segundo experimento se analizó también si la IL-6 de origen muscular podría estar afectando el almacenamiento de glucosa en el hígado. Para ello se evaluaron los niveles de glucógeno hepático (fig 4.29).

El análisis de los depósitos de glucógeno hepático mostró un descenso en los machos alimentados con dieta grasa al compararlos con los ratones alimentados con dieta control. Por lo que se refiere a las hembras, estas no presentaron ninguna diferencia significativa (fig 4.29).

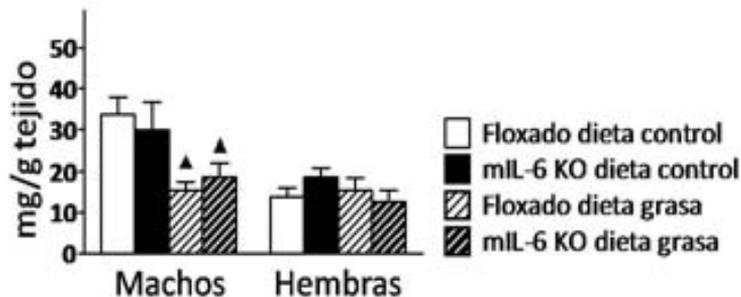


Fig 4.29: Niveles de glucógeno hepático. En machos y hembras a las 13-14 semanas de dieta. N = 10-18. ▲ $p < 0,05$ versus dieta control

4.1.2.9. Metabolitos circulantes

En el segundo experimento se analizaron diversos metabolitos a las 13-14 semanas de dieta en los animales del experimento de inyección de insulina. Para el análisis, con la intención de aumentar la n de los ratones control y dado que no se observaron diferencias entre los tratados con vehículo y los no inyectados, se usaron el resto de los animales del experimento de dietas que no formaban parte del experimento de inyección con insulina.

4.1.2.9.1. Glucosa

Tal y como esperábamos la glucemia se vio alterada tanto por el tratamiento (disminuyéndola) como por la dieta (incrementándola). El análisis estadístico reveló en los machos una interacción significativa entre la dieta y el genotipo ($p = 0,030$) y entre la dieta y el tratamiento ($p = 0,007$). Su descomposición indicó que la dieta grasa incrementaba la glucemia únicamente en en los ratones floxados,

Resultados

independientemente de la administración de insulina. Al contrario que con la dieta grasa, con la dieta control no se vio el efecto de la deficiencia de IL-6. En las hembras la interacción de la dieta y el tratamiento también fue significativa ($p = 0,007$), el aumento de la glucemia causado por la dieta grasa no se vio afectado por la deficiencia de la IL-6 y solamente ocurrió en los ratones inyectados con vehículo (fig 4.30).

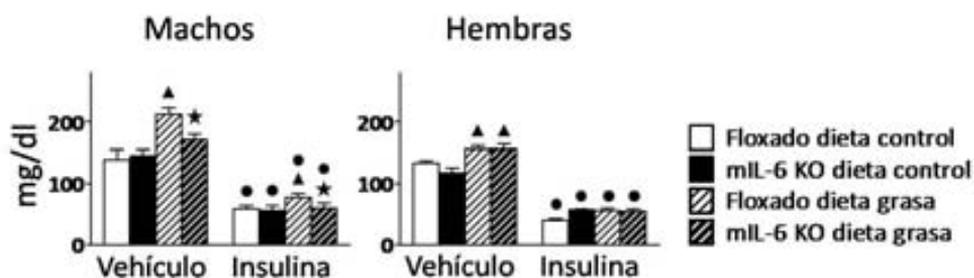


Fig 4.30: Niveles de glucosa circulante a las 13-14 semanas de dieta. Los ratones se privaron de la comida 4h y posteriormente se inyectaron intraperitonealmente con insulina o vehículo, $n = 4-18$. ▲, ★ y ● $p < 0,05$ versus los grupos correspondientes de dieta control, floxado y vehículo, respectivamente.

4.1.2.9.2. Triglicéridos

Los ratones inyectados con insulina presentaron una disminución de los niveles circulantes de triglicéridos. En los machos, además, se observó un pequeño descenso adicional causado por la deficiencia de IL-6 muscular, pero la dieta grasa no tuvo ningún efecto (fig 4.31). En el caso de las hembras la interacción de la dieta y el tratamiento fue significativa ($p = 0,000$), y al descomponerla se observó efecto de la dieta grasa, aumentando los triglicéridos circulantes pero únicamente en los animales tratados con vehículo, así mismo el efecto del tratamiento con la insulina sólo se vio en las alimentadas con dieta grasa (fig 4.31).

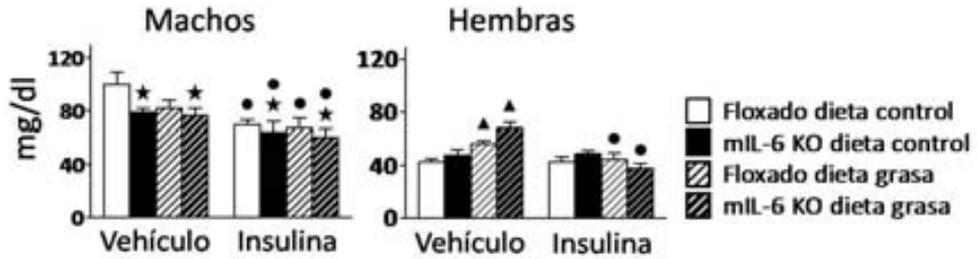


Fig 4.31: Niveles de triglicéridos circulante a las 13-14 semanas de dieta. Los ratones fueron privados de la comida 4h y posteriormente se inyectaron intraperitonealmente con insulina, n = 4-18. ★ y ● p < 0,05 versus los grupos correspondientes de floxado y vehículo, respectivamente.

4.1.2.9.3. Colesterol

En los machos la interacción dieta y genotipo fue significativa ($p = 0,047$), y su descomposición, mostró que la dieta grasa incrementó el colesterol circulante sólo en los ratones floxados, mientras que en los ratones mL-6 KO este incremento se vio disminuido (fig 4.32). En el caso de las hembras la interacción dieta, genotipo y tratamiento fue significativa ($p = 0,012$), al descomponerla se obtuvo que la dieta grasa aumentó los niveles de colesterol circulantes, aunque en el caso de las mL-6 KO no se dio el aumento en las tratadas con insulina donde además las alimentadas con dieta control e inyectadas con insulina presentaron niveles más altos que las floxadas (fig 4.32).

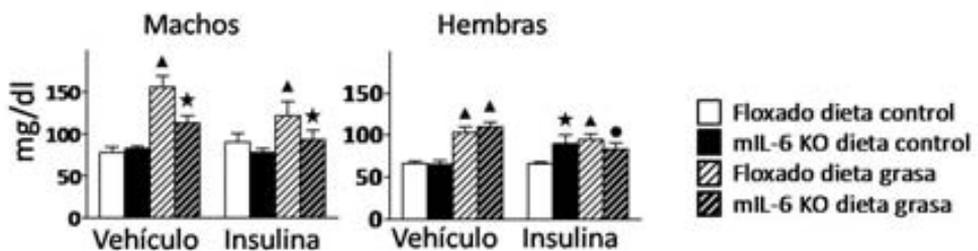


Fig 4.32: Niveles de colesterol circulante a las 13-14 semanas de dieta. Los ratones fueron privados de la comida 4h y posteriormente se inyectaron intraperitonealmente con insulina, n = 4-18. ▲, ★ y ● p < 0,05 versus los grupos correspondientes de dieta control, floxado y vehículo, respectivamente.

Resultados

4.1.2.10. Hormonas

Se analizaron los niveles de insulina a los 15 minutos de la administración de 2g de glucosa por kg de ratón (en la muestra de plasma obtenida durante la OGTT) y los niveles de insulina y leptina tras la eutanasia (a las semana 13-14 de dieta).

4.1.2.10.1. Insulina

En el primer experimento, en la muestra de sangre tomada durante la OGTT a los 15 minutos de la administración de la glucosa oral se midieron los niveles de insulina. Se observó un aumento significativo de insulina en los ratones alimentados con dieta grasa en ambos sexos (fig 4.33), pero no se observó ningún efecto debido a la deficiencia de IL-6 muscular, aunque en los machos alimentados con dieta grasa se observó un menor aumento de los niveles de insulina (fig 4.33).

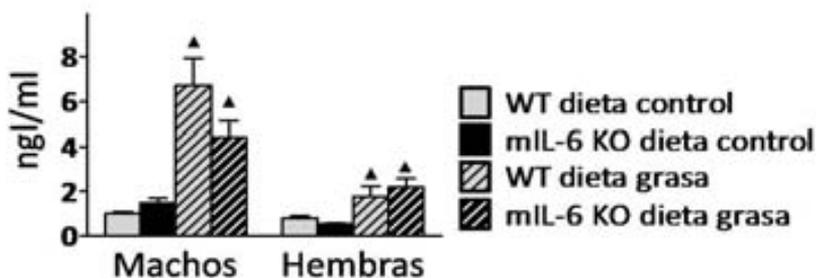


Fig 4.33: Niveles de insulina a los 15 min del inicio de la OGTT, n = 9-17. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

En el segundo experimento se analizaron los niveles de insulina de los ratones a las 13-14 semanas de dieta. En los animales alimentados con dieta grasa los niveles de insulina aumentaron (fig 4.34). Por otro lado la deficiencia de IL-6 muscular en los machos produjo una disminución de los niveles de insulina (fig 4.34).

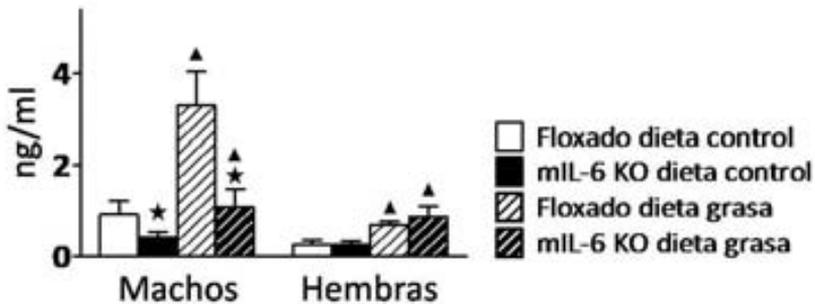


Fig 4.34: Niveles de insulina circulante a las 13-14 semanas de dieta, n = 4 - 13. ▲ y ★ p < 0,05 versus dieta control y ratones floxados, respectivamente.

4.1.2.10.2. Leptina

Para el análisis de la leptina se juntaron los datos de los animales en dieta incluidos los animales con los que se realizó el experimento de inyección de insulina y dado que no se observó efecto de la insulina, no se tuvo en cuenta el tratamiento. Los niveles de leptina aumentaron en los ratones alimentados con dieta grasa de ambos sexos. En el caso de las hembras la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa (p = 0,034), al descomponer la interacción se observó que la deficiencia de IL-6 muscular incrementó la leptina solamente en las alimentadas con dieta grasa (fig 4.35).

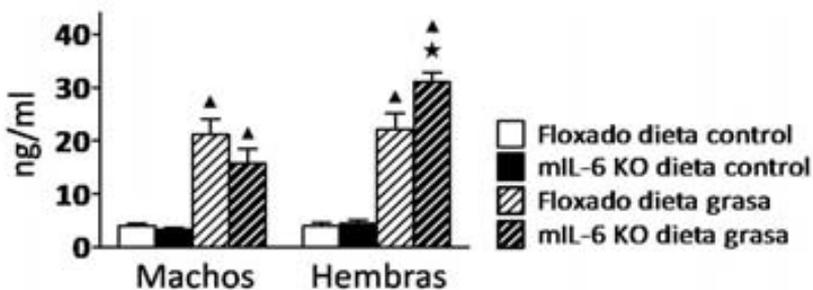


Fig 4.35: Niveles de leptina circulante a las 13-14 semanas de dieta, n = 10-19. ▲ y ★ p < 0,05 versus los grupos correspondientes de dieta control y floxados, respectivamente.

Resultados

4.1.2.11. Expresión génica

Para estudiar como podría estar afectando la delección de IL-6 muscular a diferentes vías metabólicas, así como a otros genes implicados en otras funciones, se realizó un análisis de expresión génica mediante la técnica de la *real time* qPCR. Los tejidos en los que se hizo el estudio fueron el hígado, el tejido adiposo (subcutáneo) y músculo esquelético (gastrocnemio) de los ratones del experimento de inyección de insulina, realizado con los animales del segundo experimento de dietas. En la mayoría de los genes analizados no se observó el efecto de la inyección de insulina a los 30 minutos, así que para facilitar el análisis se decidió, que en estos casos, no se tendría en cuenta el factor tratamiento.

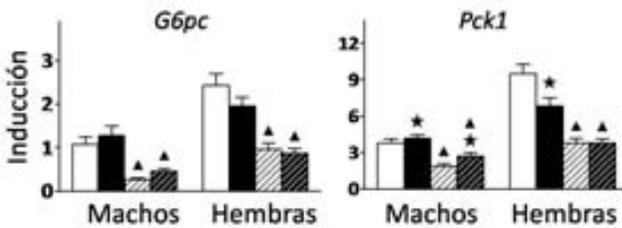
4.1.2.11.1. Genes implicados en el metabolismo de la glucosa

Se analizaron diversos genes implicados en la vía de la gluconeogénesis en el hígado. Se midió la expresión del gen *G6pc*, que codifica para el enzima glucosa-6-fosfatasa (G6pasa), y *Pck1*, que codifica para el enzima PEPCK (fosfoenol piruvato carboxiquinasa). La dieta grasa causó la inhibición de la síntesis de glucosa inhibiendo la expresión de los genes que codificaban para ambas enzimas (fig). La deficiencia de IL-6 muscular tuvo un efecto sexo dependiente, los machos mIL-6 KO mostraron una tendencia a aumentar la expresión de estos genes, mientras que en las hembras se observó la tendencia contraria. El análisis estadístico de las variaciones en la expresión de los genes que codifican para estas enzimas debidas a la deficiencia de IL-6 sólo fueron significativas en el caso de la PEPCK, en el caso de las hembras la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,015$), su descomposición indica que el efecto de la deficiencia de IL-6 muscular causó un descenso de la expresión de PEPCK sólo en las alimentadas con dieta control (fig 4.36a).

Resultados

Una de las enzimas claves en la degradación de la glucosa es la 6-fosfofructoquinasa (PFK). Para estudiar si estaba afectada la vía de la glucólisis se analizó la expresión de la PFK midiendo la expresión del gen *Pfkl* que codifica para la enzima hepática y la del gen *Pfkm* que codifica para la enzima que se expresa en el músculo esquelético (fig 4.36b). La expresión de estos genes no se vio afectada por la dieta grasa en ninguno de los dos tejidos ni en ninguno de los dos sexos. Los machos mL-6 KO mostraron una disminución significativa de la expresión de la PFK en el hígado. En cuanto a la enzima muscular sólo mostraron una disminución de la expresión de este gen los machos mL-6 KO alimentados con dieta grasa, aunque esta no llegó a ser significativa. Por lo que respecta a las hembras mL-6 KO, no se observaron diferencias en la expresión de la PFK hepática, pero si que hubo una disminución de la expresión del gen que codifica para la enzima PFK muscular.

A. Gluconeogénesis en el hígado



B. Glucólisis

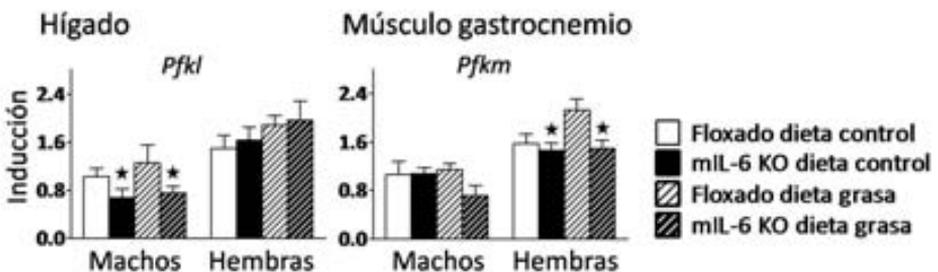


Fig 4.36: Expresión génica implicada en el metabolismo de la glucosa. A. Expresión en el hígado de genes implicados en la gluconeogénesis. **B.** Expresión de genes implicados en la glucólisis en el hígado y en el músculo esquelético, n = 7-12. .▲ y ★ p < 0,05 versus grupo correspondiente de dieta control y ratones floxados, respectivamente.

Resultados

4.1.2.11.2. Genes implicados en el metabolismo de los lípidos

Para el estudio de los genes implicados en el metabolismo de los lípidos se analizaron varios genes claves en la síntesis de ácidos grasos como son la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS), para ello se miraron la expresión de los genes *Acaca* (ACC) y *Fasn* (FAS) en el hígado y en el tejido adiposo subcutáneo (fig 4.37a y 4.37b). La expresión de estas enzimas en el hígado se vio disminuida en los ratones alimentados con dieta grasa tanto en machos como en hembras. En las hembras la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa en ambos genes ($p = 0,002$ para la ACC y $p = 0,020$ para FAS). En el primer caso la descomposición de la interacción mostró una disminución significativa con la dieta grasa de la expresión de este gen en los ratones floxados, mientras que la deficiencia de IL-6 muscular sólo disminuyó significativamente la expresión de ACC en las hembras alimentadas con dieta control (fig 4.37a). En el caso del gen FAS, al hacer la descomposición, el efecto de la deficiencia de IL-6 muscular no llegó a ser significativo, y al igual que con la ACC, la dieta grasa disminuyó su expresión sólo en las hembras floxadas con dieta grasa. Por lo que respecta a los machos, mientras que la deficiencia de IL-6 no tuvo efecto, la dieta grasa disminuyó significativamente la expresión de estos genes (fig 4.37a). La expresión de estos genes en el tejido adiposo subcutáneo también se vio disminuida en los ratones alimentados con dieta grasa. Por otro lado, en este tejido no se observó ninguna diferencia significativa debida al genotipo (fig 4.37b).

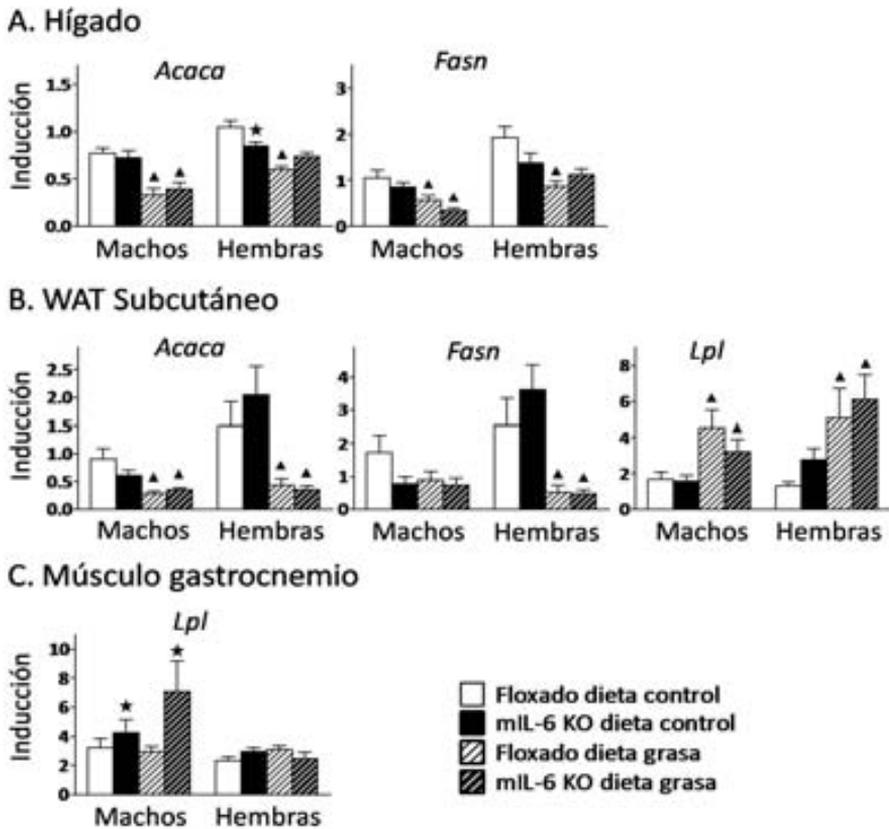


Fig 4.37: Expresión génica implicada en el metabolismo de los lípidos. **A.** Expresión en el hígado de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos. **B.** Expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo subcutáneo. **C.** Expresión génica de la LPL en el músculo gastrocnemio, $n = 7-12$. \blacktriangle y \star $p < 0,05$ versus grupo correspondiente de dieta control y ratones flojados, respectivamente.

Tanto el tejido adiposo como el muscular captan ácidos grasos circulantes, ya sea para almacenarlos en forma de triacilglicerol (tejido adiposo) o bien para obtener energía a partir de la oxidación de estos (músculo). Una enzima importante en este proceso es la lipoproteína lipasa (LPL) que está implicada en la hidrólisis de los triacilglicerolos. La expresión del gen *Lpl*, que codifica para la enzima LPL, en el tejido adiposo subcutáneo aumentó en los ratones alimentados con dieta grasa. (fig 4.37b y 4.37c).

Resultados

En el músculo gastrocnemio no hubo efecto de la dieta sobre la expresión del gen *Lpl*. En cambio, la deficiencia de IL-6 produjo un aumento de su expresión en los machos. En el caso de las hembras la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,038$), pero cuando se realizó la descomposición no apareció ninguna significación (fig 4.37c).

4.1.2.11.3. Otros genes relacionados con el metabolismo

El gen *Ppargc1a* que codifica para la PGC1 α (coactivador del receptor activado por proliferador de peroxisomas γ) se analizó por su papel en la regulación del metabolismo celular. La expresión de este gen se vio afectada significativamente en el hígado de las hembras, en donde la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa, y al descomponer ésta, se observó una disminución con la dieta grasa en las hembras floxadas y un descenso en las mL-6 KO en dieta control (fig 4.38a). No se observaron cambios en la expresión de este gen ni en el músculo gastrocnemio, ni en el tejido adiposo subcutáneo (fig 4.38b y 4.38c).

En estos tejidos también se analizó la expresión del gen *Ucp2* (*proteína desacoplante 2*) que codifica para una proteína mitocondrial con un papel en la disipación de energía, y del que se han descrito cambios de su expresión en obesidad. En el hígado de los machos la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,003$), y la descomposición de ésta mostró que los niveles de expresión de este gen estaban aumentados en los machos mL-6 KO alimentados con dieta grasa de forma significativa. Por otro lado, en el tejido adiposo subcutáneo la deficiencia de IL-6 produjo un aumento significativo de la expresión del gen *Ucp2* en machos. En el caso de las hembras, también se observó un aumento de la expresión de este gen, pero fue marginalmente

significativa ($p = 0,055$) (fig 4.38b). No se observaron cambios significativos en la expresión del gen de la UCP2 en el músculo gastrocnemio (fig 4.38c).

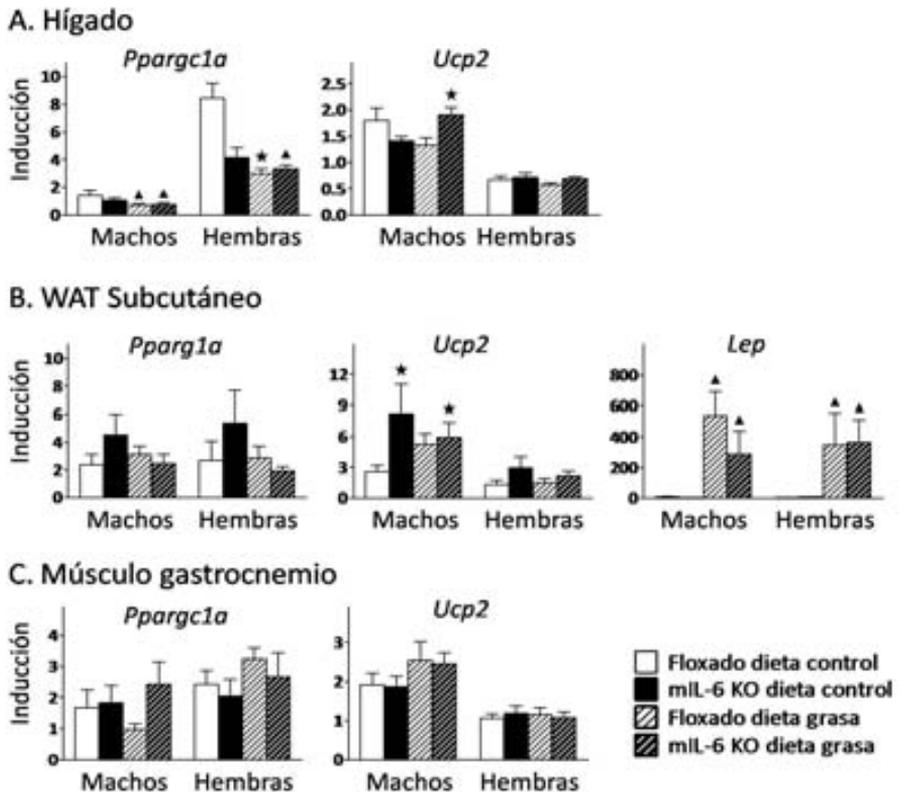


Fig 4.38: Expresión génica de los genes: A. *Pparg1a* y *Ucp2* en hígado. B. *Pparg1a*, *Ucp2* y *Lep* en tejido adiposo subcutáneo. C. *Pparg1a* y *Ucp2* en músculo gastrocnemio, $n = 5-12$. ▲ ★ y ● $p < 0,05$ versus los grupos correspondientes de dieta control, flojado y vehículo, respectivamente.

En el tejido adiposo subcutáneo también se analizó la expresión del gen *Lep* que codifica para la leptina. Tal y como se esperaba, los animales alimentados con dieta grasa presentaron niveles de expresión de este gen mucho más altos que los animales alimentados con dieta control en ambos sexos. No hubo efectos significativos de la deficiencia de IL-6 muscular (fig 4.38b).

Resultados

4.1.2.11.4. Genes implicados en inflamación

Al analizar la expresión de la IL-6 por RT-qPCR, tal y como habíamos comprobado, los ratones mL-6 KO presentaron una disminución significativa de la expresión del gen de la IL-6 en el músculo esquelético (en este caso el músculo gastrocnemio) que no se observó ni en el hígado, ni en el tejido adiposo subcutáneo (fig 4.39).

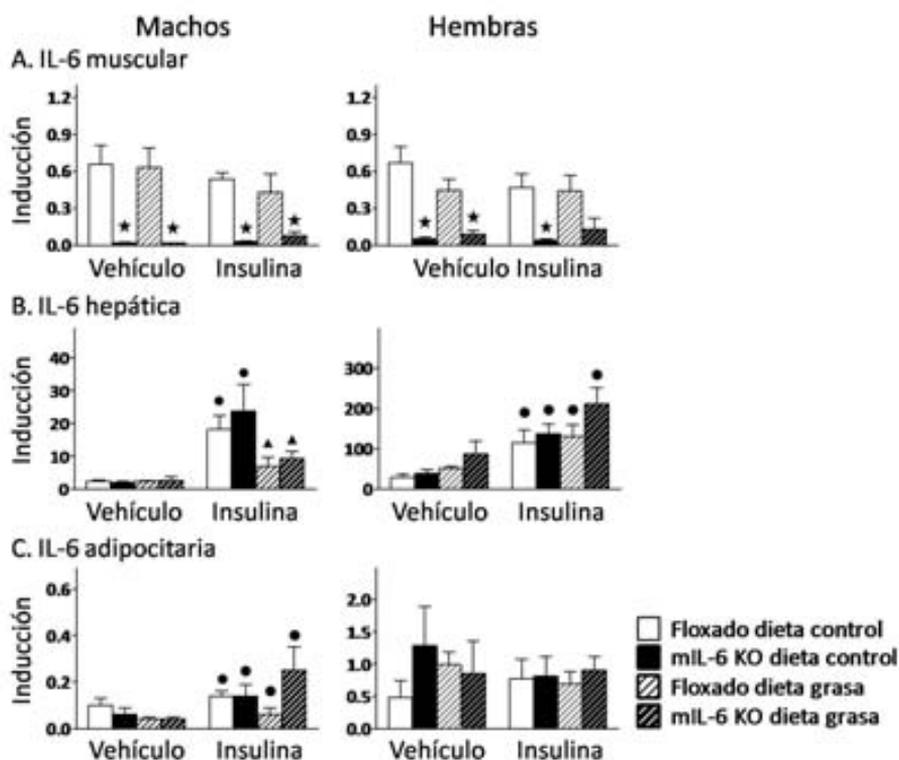


Fig 4.39: Expresión génica de la IL-6. A. Expresión génica de la IL-6 en músculo gastrocnemio. B. Expresión génica de la IL-6 en hígado. C. Expresión génica de la IL-6 en tejido adiposo subcutáneo, n = 3-6. ▲, ★ y ● p < 0,05 versus los grupos correspondientes de dieta control, floxado y vehículo, respectivamente.

La inyección de insulina produjo un aumento significativo en la expresión del gen de IL-6 en el hígado; en los machos la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,018$) y al hacer la descomposición se vio que los ratones

alimentados con dieta grasa respondían menos que los de dieta control (fig 4.39b). En el tejido adiposo subcutáneo el tratamiento con insulina aumentó la expresión del gen de la IL-6 sólo en los machos(fig 4.39c).

También se analizó la expresión de otra interleuquina, la IL-1 β (fig 4.40). En el hígado la IL-1 β se comportó de manera parecida a la IL-6 en algunos aspectos. En este tejido la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa en ambos sexos ($p = 0,037$ en los machos y $p = 0,001$ en la hembras), en ambos casos la descomposición de la interacción mostró un aumento significativo de la expresión de este gen en los ratones inyectados con insulina, que fue menor en los animales en dieta grasa en ambos sexos (fig 4.40b).

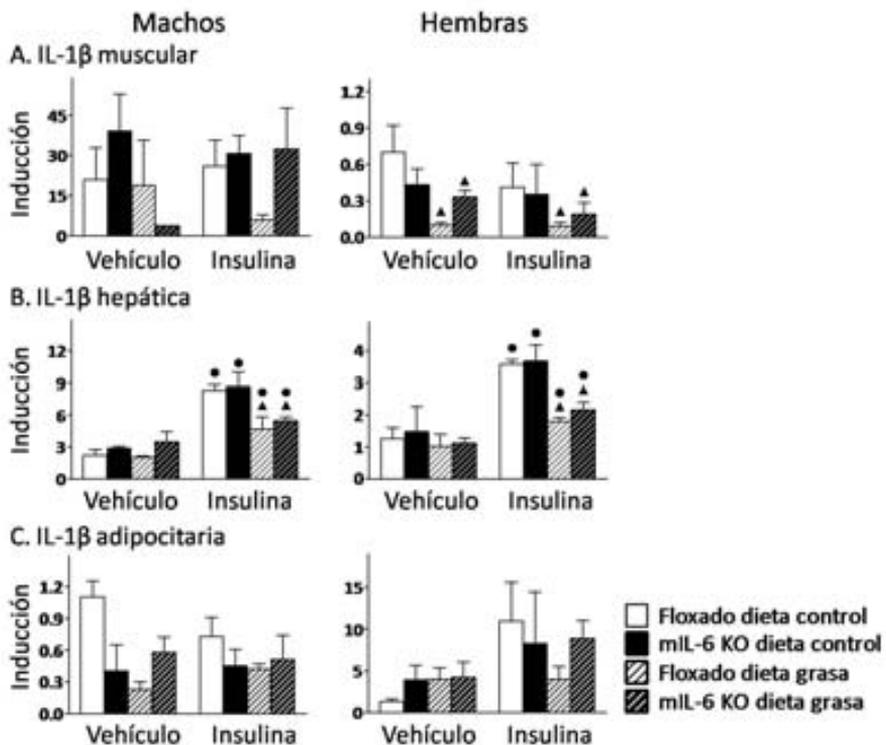


Fig 4.40: Expresión génica de la IL-1 β . A. Expresión génica de la IL-1 β en músculo gastrocnemio. B. Expresión génica de la IL-1 β en hígado. C. Expresión génica de la IL-1 β en tejido adiposo subcutáneo, $n = 3-6$. \blacktriangle y \bullet $p < 0,05$ versus los grupos correspondientes de dieta control y vehículo, respectivamente.

Resultados

En el músculo gastrocnemio la dieta grasa produjo una disminución de la expresión de IL-1 β en las hembras. Por otro lado, en el tejido adiposo subcutáneo no se observaron diferencias significativas ni por la dieta ni por la deficiencia de IL-6 muscular en ninguno de los sexos (fig 4.40a).

El F4/80, codificado por el gen *Emr1*, es un marcador de macrófagos maduros de tejido. En el tejido adiposo subcutáneo se observó un aumento significativo de la expresión de F4/80 en los ratones alimentados con dieta grasa de ambos sexos (fig 4.41a).

En el músculo gastrocnemio los machos mIL-6 KO mostraron un aumento de la expresión de F4/80 respecto a los machos floxados, independientemente de la dieta. No se observó ningún cambio en la expresión de este gen en el músculo gastrocnemio de las hembras (fig 4.41b). Por otro lado, en el hígado los machos alimentados con dieta grasa mostraron un descenso de la expresión del gen *Emr1* independientemente del genotipo, mientras que las hembras no mostraron diferencias significativas (fig 4.41c).

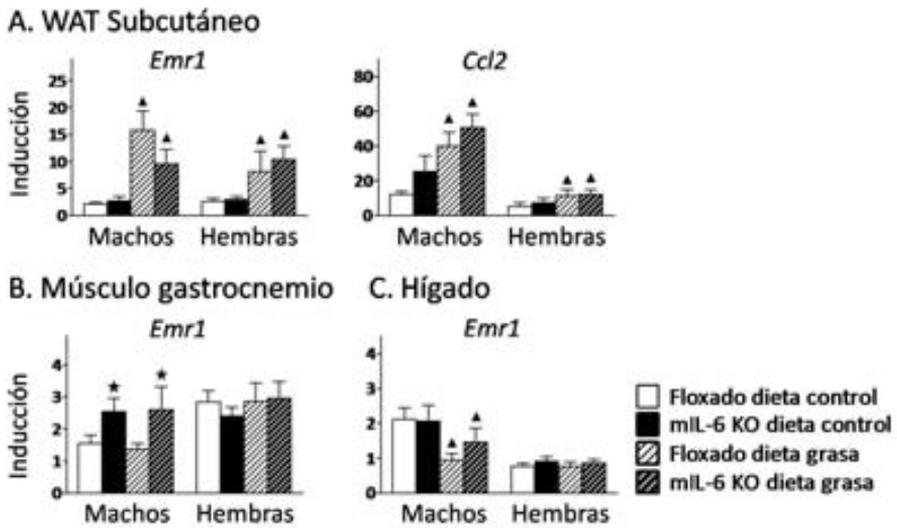


Fig 4.41: Expresión génica implicada en inflamación. A. Expresión génica de la *Emr1* y *Ccl2* en tejido adiposo subcutáneo. B. Expresión génica de *Emr1* en músculo gastrocnemio. C. Expresión génica de la *Emr1* en hígado, n = 7-12. ▲ y ★ p < 0,05 versus los grupos correspondientes de dieta control, y ratones floxado, respectivamente.

El gen *Ccl2* que codifica para la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) se analizó en el tejido adiposo subcutáneo. En ambos sexos, los ratones alimentados con dieta grasa mostraron un aumento de la expresión de este gen. Por otro lado, la deficiencia de IL-6 no mostró ningún efecto (fig 4.41a).

Resultados

4.2. Knock-out condicionales para la IL-6 en tejido adiposo

4.2.1. Caracterización en condiciones basales

4.2.1.1. Efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria en la supervivencia

El *knock-out* condicional para la IL-6 en tejido adiposo (aIL-6 KO) era un modelo de *knock-out* condicional inducible, es decir, que para que tuviera lugar la delección era necesario activar el promotor al que está unida la recombinasa Cre para que ésta se transcriba. Así el fenotipo no se manifestó hasta que se causó la delección del exón 2 del gen de la IL-6 tratando a los animales con tamoxifeno. Por este motivo presentamos los datos del análisis de frecuencias de los genotipos para la recombinasa cre y para la IL-6 por separado. No se observó ningún efecto en la supervivencia de estos animales a partir del destete, ni tras el tratamiento con tamoxifeno. El análisis de la distribución para el gen de la IL-6 (con las dianas loxP en uno o en los dos alelos) mostró las ratio mendelianas esperadas (tabla 4.3). En el caso del gen que codificaba para la recombinasa Cre las frecuencias estaban alteradas observándose un mayor número de ratones Cre positivos que ratones sin la recombinasa Cre (tabla 4.3). Con respecto a la distribución de los sexos en estos animales la ratio mendeliana fue la esperada (tabla 4.3).

Tabla 4.3: Tabla de contingencia: Muestra las frecuencias de genotipos y sexos en el destete. El análisis de la χ^2 de las crías destetadas muestra que no hay efecto de la deficiencia de IL-6 en las frecuencias de los genes para la IL-6 ($\chi^2(1, N = 932) = 2,270, p = 0,132$). Se observó una mayor frecuencia genotípica en el gen de la recombinasa cre ($\chi^2(1, N = 932) = 4,395, p = 0,036$). La distribución de sexos fue la esperada ($\chi^2(1, N = 932) = 3,129, p = 0,077$).

Genotipo	N observada	N esperada	Residual
Flox/WT	489	466	23,0
Flox/Flox	443	466	-23,0
Total	932		

Genotipo	N observada	N esperada	Residual
Cre-	434	466	-32
Cre+	498	466	32,0
Total	932		

Sexo	N observada	N esperada	Residual
Hembras	439	466	-27,0
Machos	493	466	27,0
Total	932		

4.1.1.2. Efectividad de la delección del exón 2 por la recombinasa Cre

El análisis para detectar la delección del exón 2 del gen de la IL-6 en el tejido adiposo en estos ratones se realizó usando la PCR convencional específica descrita en los *Materiales y métodos*. Los resultados mostraron que en la mayoría de los casos se había producido la delección del exón 2 de la IL-6 en el tejido adiposo visceral y en el subcutáneo, así como en el tejido adiposo marrón (BAT) (fig 4.42). En algunas ocasiones en el tejido adiposo blanco o en el tejido adiposo marrón, además de la banda de 200 pb correspondiente a la banda del gen delecionado, apareció la banda correspondiente al gen con las dianas loxP, esto podría deberse a que la delección no fue del 100% o bien podría tratarse de DNA proveniente de otros tipos celulares que forman parte del mismo tejido, como células endoteliales en los que no se ha delecionado el gen (fig 4.42).

Resultados

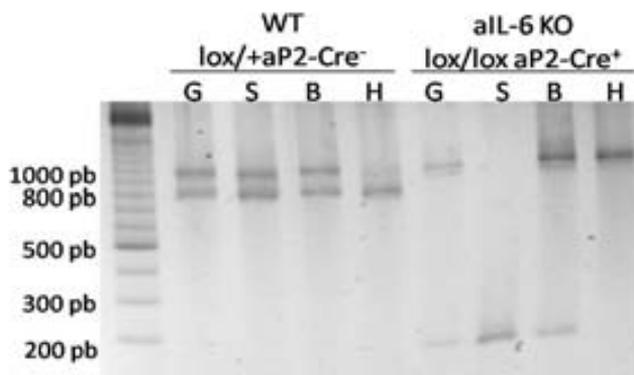


Fig 4.42: PCR para la delección del exón 2 de la IL-6 El ratón *wild-type* ($lox/+ aP2-Cre^-$) muestra la banda de 900 pb para el alelo *wild-type* del gen de la IL-6 y una banda más grande de 1000 pb que corresponde al alelo flojado. La banda de 260 pb, correspondiente a la delección del exón 2 del gen de la IL-6, se observa en el tejido adiposo blanco y marrón el ratón aIL6 KO ($lox/lox aP2-Cre^+$). G: tejido adiposo visceral, S: tejido adiposo subcutáneo, B: tejido adiposo marrón y H: hígado.

Se estudió por RT-qPCR la expresión del gen de la IL-6 en diferentes tejidos. Éste mostró una disminución significativa de la expresión de este gen en el tejido adiposo visceral y en el tejido adiposo subcutáneo de los machos aIL-6 KO como cabría esperar tras deleccionar el exón 2 de este gen en estos tejidos. Inesperadamente, en las hembras sólo se detectó una tendencia a la disminución de la expresión de la IL-6 en el tejido adiposo visceral y ningún efecto en el tejido adiposo subcutáneo. Por otro lado, en el músculo esquelético, en concreto en el gastrocnemio, no se observó disminución de la expresión del gen de la IL-6, lo que apoyaría el hecho de que estaríamos deleccionando el gen de manera específica de tejido. En cambio, de forma sorprendente, en el hígado se observó una disminución de la expresión de IL-6 en los ratones aIL-6 KO, que en el caso de las hembras llegó a dar diferencias significativas, a pesar de que al hacer la PCR convencional no se obtuvo la banda correspondiente a la delección del gen. Esto podría indicar que la expresión de la IL-6 en el hígado estaría afectada por algún estímulo externo al tejido que en el caso de los animales *knock-out* condicionales

para la IL-6 en tejido adiposo estaría inhibida.

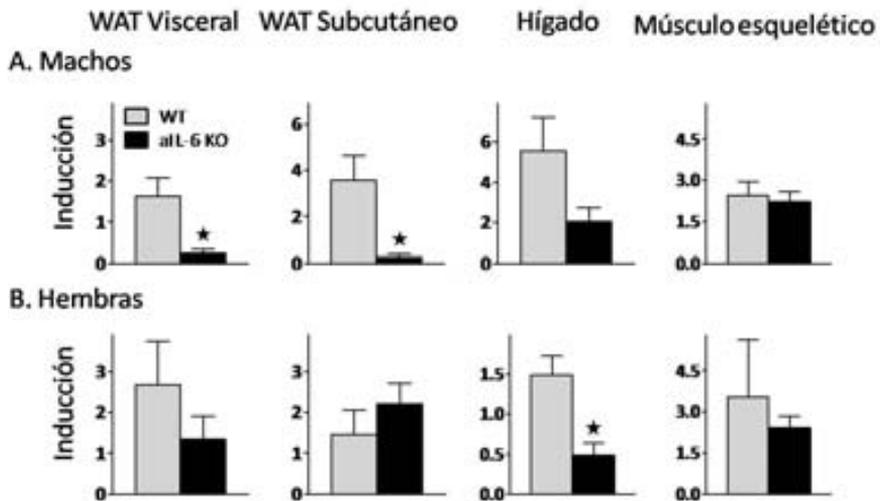


Fig 4.43: Expresión del mRNA de la IL-6 en diferentes tejidos. Los niveles de mRNA de la IL-6 se midieron con RT-qPCR en tejido adiposo (WAT) visceral, WAT subcutáneo, hígado y músculo esquelético (gastrocnemio), n = 6-8, ★ p < 0,05 versus ratones *wild-type*.

4.3.2. Obesidad inducida por dieta

Los ratones aIL-6 KO se sometieron a dieta grasa para estudiar qué papel tenía la IL-6 proveniente del tejido adiposo en el control del peso corporal y en el metabolismo. Este experimento, como en el caso del *knock-out* condicional para la IL-6 en músculo esquelético, se realizó en dos ocasiones, en la primera ocasión se compararon los aIL-6 KO con los *wild-type* por lo que se decidió repetir el experimento para en esta ocasión compararlos con ratones floxados que serían el control más apropiado. Desafortunadamente, durante el transcurso de éste hubo problemas con el abastecimiento de dieta grasa lo que en último término llevó a la invalidación de los ratones alimentados con esta dieta. Por este motivo, y a pesar de las limitaciones del modelo, en este trabajo presentaremos los datos del primer experimento donde se compararon los animales aIL-6 KO con ratones *wild-type*.

Resultados

Estos animales se sometieron a una dieta en la que el aporte calórico de la dieta grasa fue de 58,4% de kcal provenientes de la grasa de la dieta y se compararon con animales alimentados con un dieta control donde las calorías de la dieta provenientes de la grasa eran del 18%.

4.2.2.1. Evolución del peso

Los ratones sometidos a dieta grasa desarrollaron obesidad (fig 4.44 y 4.45) engordando entre un 25 y un 33% más que los animales alimentados con dieta control en el caso de los machos y entre un 46 y 70% en el caso de las hembras. A los ratones heterocigotos no se les realizó la OGTT y como esto podría afectar al incremento de peso de estos ratones, se consideró oportuno no incluirlos en el análisis estadístico, aunque en el gráfico se muestran los datos de peso absoluto y de ganancia de peso de los ratones heterocigotos.

En el caso de los machos la deficiencia de IL-6 no mostró ningún efecto significativo ni en el peso absoluto ni en la ganancia de peso (fig 4.45 y 4.46).

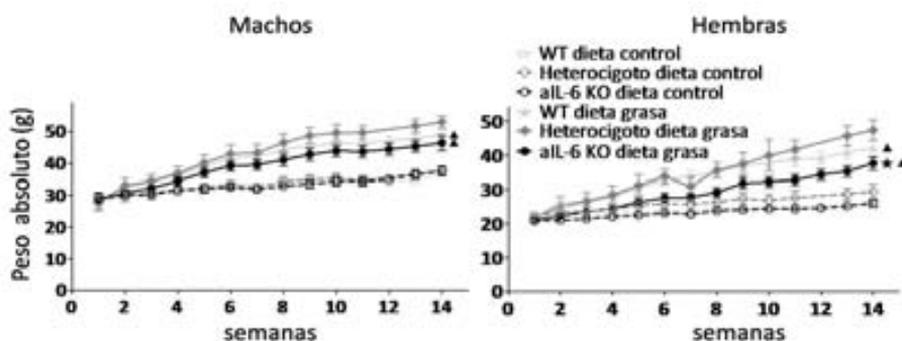


Fig 4.44: Peso absoluto de los ratones. En machos y en hembras se muestra el efecto de la dieta grasa en el peso corporal de los animales, $n= 4-25$, \blacktriangle y \star $p < 0,05$ versus dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente. El tiempo, así como la interacción del tiempo y la dieta fueron significativos en machos y hembras. La interacción del tiempo, la dieta y el genotipo y de la dieta y el genotipo también fue significativa en las hembras.

Por otro lado, en las hembras presentaron interacción significativa de la dieta, el genotipo y el tiempo ($p < 0,001$ tanto en el peso absoluto como en la ganancia de peso). La descomposición de las interacciones mostró un aumento significativo del peso absoluto y de la ganancia de peso con la dieta grasa y un efecto significativo de la deficiencia de IL-6 adipocitaria únicamente en las hembras alimentadas con dieta grasa donde se vio un menor aumento con la dieta grasa (fig 4.44 y 4.45).

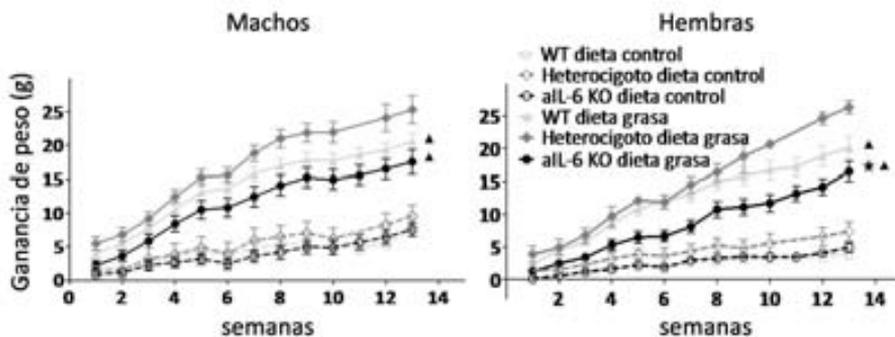


Fig 4.45: Ganancia de peso de los ratones. En machos y en hembras se muestra la ganancia de peso, $n = 4-25$, ▲ y ★ $p < 0,05$ versus dieta control y ratones *wild-type* en dieta grasa, respectivamente. El tiempo, así como la interacción del tiempo y la dieta fueron significativos en machos y hembras. La interacción del tiempo, la dieta y el genotipo y la de la dieta y el genotipo también fue significativa en las hembras.

4.2.2.2. Seguimiento de la ingesta

Para el análisis de la ingesta se utilizó el promedio de comida de cada jaula. Debido al espacio que se disponía se decidió minimizar el número de animales heterocigotos, lo que comportó que en el análisis de la ingesta algunos grupos tuvieran una $n = 1$, por lo que en este genotipo no se analizó la ingesta.

La ingesta en los machos no mostró ninguna variación ni por efecto de la dieta ni por efecto del genotipo. En cambio, en las hembras la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,05$) y su descomposición indicó que el

Resultados

efecto de la dieta sólo fue significativo en las *wild-type*, en las que la dieta grasa disminuyó la ingesta. Además, la deficiencia de IL-6 adipocitaria no mostró ningún efecto en las hembras alimentadas con dieta control, mientras que en las hembras alimentadas con dieta grasa aumentó la ingesta (fig 4.46).

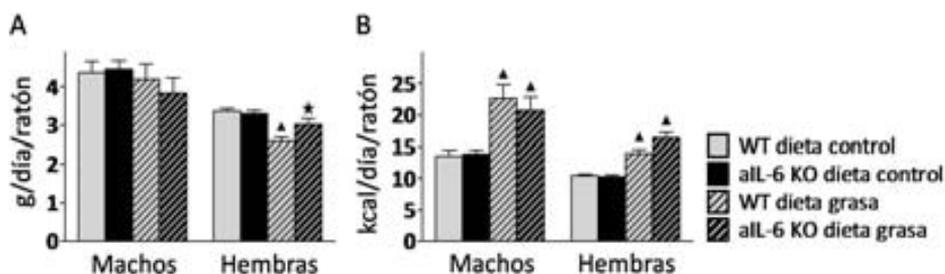


Fig 4.46: Ingesta. A. Valores de la ingesta durante la dieta en gramos por animal y día. B. Valores de la ingesta durante la dieta en kcal por animal y día, n = 3-5. ▲ y ★ p < 0,05 versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

Se calcularon las calorías ingeridas a partir de la densidad energética de la dieta. Los datos mostraron un aumento de las calorías ingeridas en los animales alimentados con dieta grasa respecto a los animales alimentados con dieta control. La deficiencia de IL-6 adipocitaria no tuvo efectos significativos en los machos. Por lo que respecta a las hembras, la deficiencia de IL-6 adipocitaria no mostró efecto en las alimentadas con dieta control, pero cuando éstas eran alimentadas con dieta grasa la deficiencia de IL-6 tendía a aumentar la ingesta de calorías; esta interacción fue marginalmente significativa ($p = 0,054$) (fig 4.46b).

Para el cálculo de la eficiencia alimentaria se utilizó la ratio ganancia de peso/kcal consumidas. Los datos obtenidos muestran que la dieta grasa es significativamente más eficiente que la dieta control tanto en los machos como en las hembras (fig 4.47). Por otro lado, la deficiencia de IL-6 en el tejido adiposo

no tuvo ningún efecto en la eficiencia alimentaria.

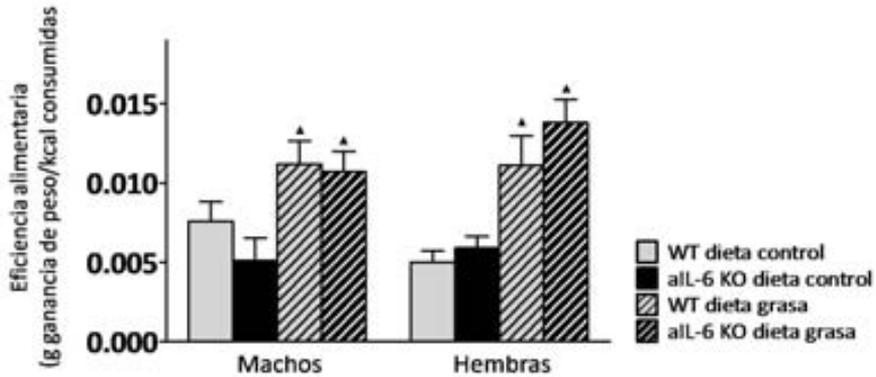


Fig 4.47: Eficiencia alimentaria. En machos y en hembras se muestran los valores de la eficiencia alimentaria durante la dieta, n = 12-25. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

4.2.2.3. Tejidos

Al eutanasiar los animales dado el número de ratones y muestras que se extrajeron de cada uno se decidió priorizar la comparación de los animales aIL-6 KO con los *wild-type*, que en aquel momento se consideró lo más apropiado. Los datos presentados de aquí en adelante se basarán en la comparación de los ratones aIL-6 KO con *wild-type*.

4.2.2.3.1. Peso de los tejidos

El efecto de la dieta grasa también se vio en el peso de los tejidos, así se observó un aumento de peso en el tejido adiposo visceral y subcutáneo, en el tejido adiposo marrón y en el hígado de los ratones alimentados con dieta grasa de ambos sexos. En el peso absoluto del tejido adiposo visceral de los machos la interacción de la dieta con el genotipo fue significativa (p = 0,019); al descomponer ésta se vio que la deficiencia de IL-6 adipocitaria tendió a limitar el

Resultados

aumento del peso del tejido en los animales alimentados con la dieta grasa aunque no llego a ser significativo, en cambio la dieta grasa aumentó significativamente el peso absoluto del tejido adiposo visceral en ambos genotipos (fig 4.48). Por otro lado, en las hembras, el único tejido de los analizados en el que se vio efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria fue en el hígado de las alimentadas con dieta grasa, donde limitó el incremento del peso hepático (fig 4.48). Así mismo en este tejido el efecto de la dieta solamente se dio en las hembras *wild-type*.

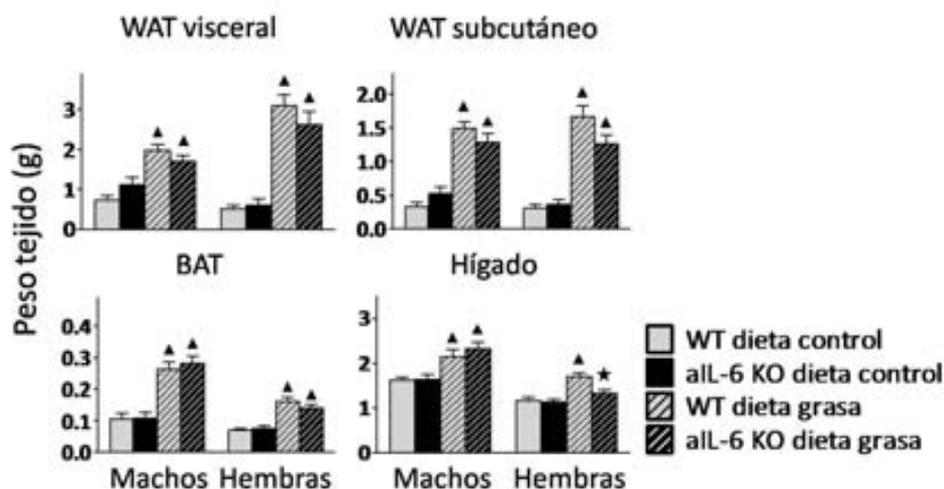


Fig 4.48: Peso absoluto de los tejidos, n = 12-23. ▲ y ★ p < 0,05 versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

Cuando se calculó el peso relativo de estos tejidos respecto al peso total de los animales, el efecto de la dieta se mantuvo en el tejido adiposo visceral y subcutáneo, en el tejido adiposo marrón y en el hígado de las hembras. En el tejido adiposo visceral y en el subcutáneo de los machos la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,035$ y $0,022$, respectivamente); su descomposición indicó que el efecto de la dieta grasa era mayor en los *wild-type* que en los aIL-6 KO, al menos en parte porque la deficiencia de IL-6 adipocitaria

tiende a aumentar el peso en dieta control (fig 4.49). Por lo que se refiere a las hembras en todos los tejidos se observó un efecto de la dieta grasa, en el tejido adiposo visceral, subcutáneo y marrón aumentando su peso relativo y en el hígado disminuyéndolo; en cambio, la deficiencia de IL-6 adipocitaria no tuvo efecto (fig 4.49).

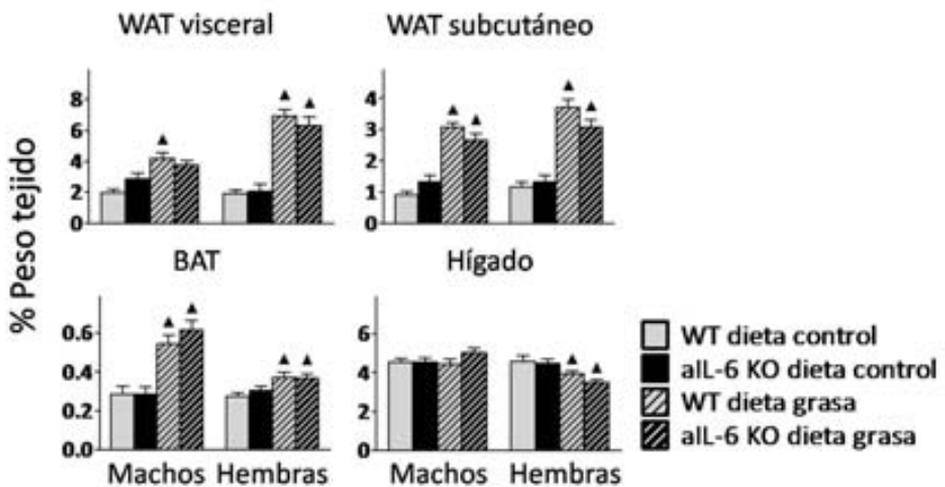


Fig 4.49: Peso relativo de los tejidos, n = 12-23. ▲ y ★ p < 0,05 versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

4.2.2.3.2. Análisis de los adipocitos

El análisis del tamaño de los adipocitos mostró que en el tejido adiposo visceral los ratones alimentados con dieta grasa tenían adipocitos de mayor tamaño que los ratones alimentados con dieta control en ambos sexos (fig 4.50). En el caso de los machos la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,000$), y al descomponer la interacción se vio que el efecto de la dieta sólo se dio en en los ratones *wild-type*, los ratones alimentados con dieta control mostraban una clara tendencia a tener adipocitos de mayor tamaño, y prácticamente no mostraban cambios con la dieta grasa (fig 4.50). En el tejido adiposo subcutáneo de los machos la interacción de la dieta con el genotipo

Resultados

también fue significativa ($p = 0,010$), pero en esta ocasión al descomponer la interacción no se observó efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria (fig 4.51). En el caso de las hembras, en el tejido adiposo visceral la deficiencia de IL-6 no mostró efecto, pero en el tejido adiposo subcutáneo causó una disminución del tamaño de los adipocitos que no llegó a ser significativa ($p = 0,067$) (fig 4.51).

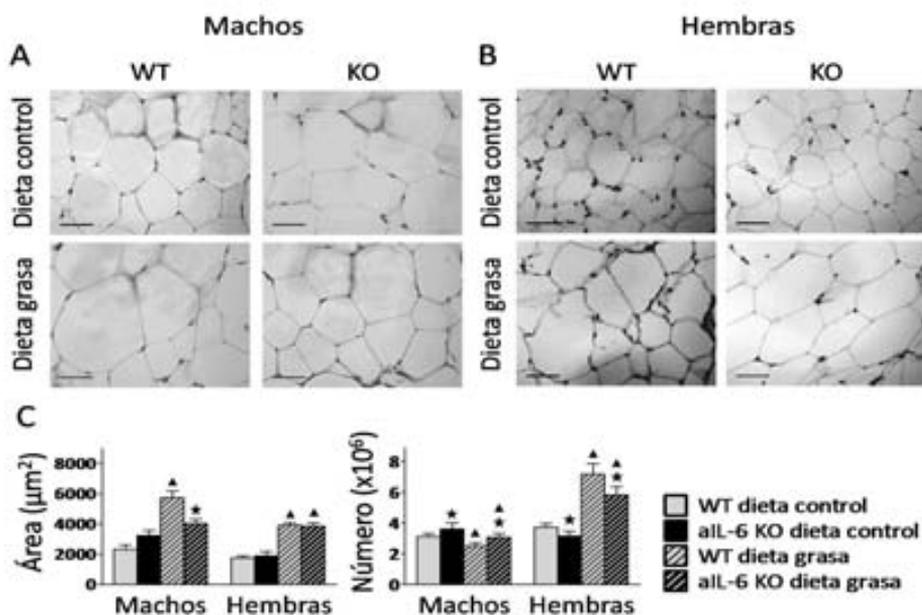


Fig 4.50: Tamaño y número de adipocitos del tejido adiposo visceral. Tinción hematoxilina y eosina del tejido adiposo visceral (A) en machos y (B) en hembras; barra de escala: 50 µm. C. Tamaño y número de adipocitos del tejido visceral, $n = 7-11$. ▲ y ★ $p < 0,05$ versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

Se analizó también el número de adipocitos de estos tejidos. En el tejido adiposo visceral se observó un efecto de la dieta grasa dependiente del sexo, disminuyendo el número de adipocitos en los machos y aumentándolo en las hembras (fig 4.50c). La deficiencia de IL-6 afectó significativamente al número de adipocitos también de manera dependiente del sexo, presentando los machos aIL-6 KO un mayor número de células que los machos *wild-type* y lo contrario las

hembras. El tejido adiposo subcutáneo se comportó de un modo distinto. No se observó efecto ni de la dieta ni de la deficiencia de IL-6 adipocitaria en las hembras. En el caso de los machos se observó un efecto significativo de la dieta grasa que disminuyó el número de adipocitos (fig 4.51c).

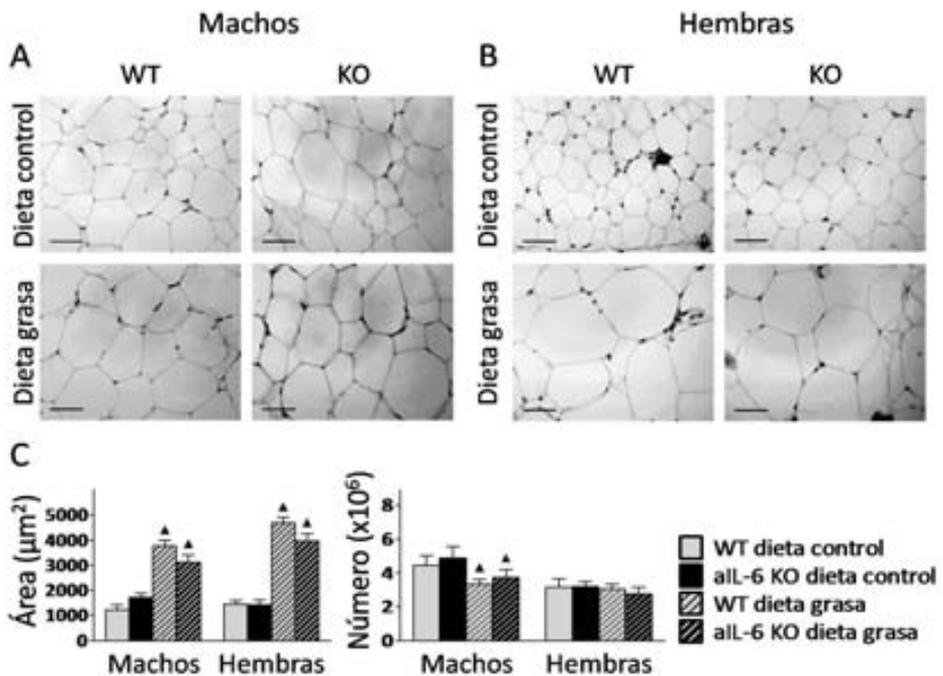


Fig 4.51: Tamaño y número de adipocitos del tejido adiposo subcutáneo. Tinción hematoxilina y eosina del tejido adiposo subcutáneo (A) en machos y (B) en hembras; barra de escala: 50 µm. C. Tamaño y número de adipocitos del tejido subcutáneo, n = 7-11. ▲ y ★ p < 0,05 versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

4.2.2.3.3. Esteatosis hepática

Los ratones alimentados con dieta grasa presentaron un aumento de la esteatosis hepática comparados con los animales alimentados con dieta control tanto en los machos como en las hembras. No se observó efecto significativo de la deficiencia de IL-6 adipocitaria en los machos, pero las hembras presentaron

Resultados

una tendencia no significativa ($p = 0,085$) a acumular menos grasas en el hígado (fig 4.52).

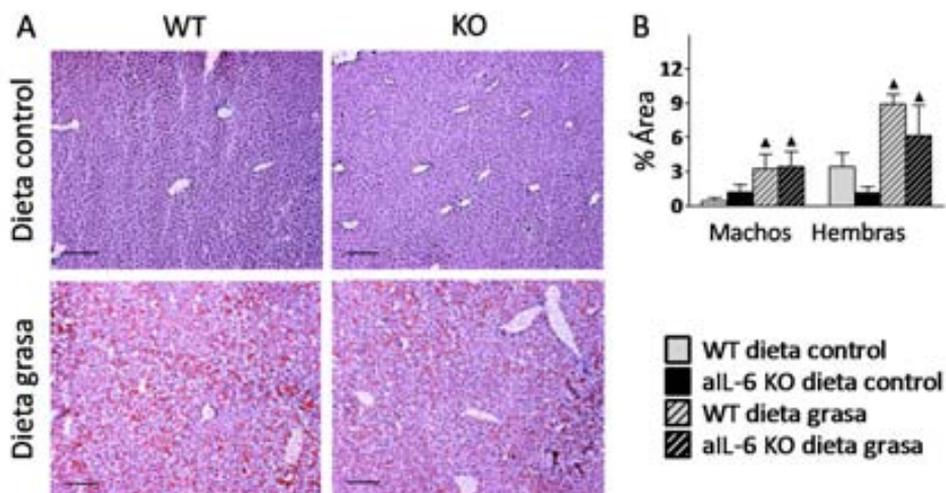


Fig 4.52: Esteatosis hepática. A. Tinción de aceite rojo O en criosecciones de hígado de hembras, barra de escala: 50 μ m. B. Porcentaje de área teñida en machos y hembras, n = 3-6. \blacktriangle $p < 0,05$ versus dieta control.

4.2.2.3.4. Tibia y tibialis

Para determinar si la delección de la IL-6 adipocitaria tenía algún efecto en el crecimiento de los animales se pesó el músculo tibialis y se midió la longitud de la tibia. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas (fig 4.53a i 4.53b). Además, al normalizar el peso del músculo tibialis con la longitud de la tibia tampoco se observaron diferencias (fig 4.53d). Por otro lado la dieta grasa disminuyó el peso relativo de este tejido en ambos sexos (fig 4.53c).

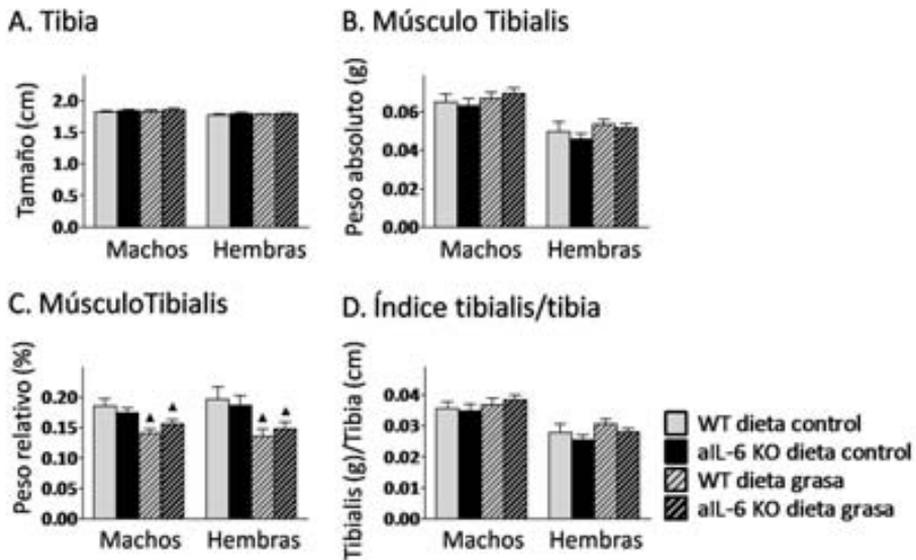


Fig 4.53: Crecimiento. A. Longitud de la tibia. B. Peso absoluto del músculo tibialis. C. Peso relativo del músculo tibialis. D. Peso del músculo tibialis normalizado por la longitud de la tibia, n = 12 -24. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

4.2.2.4. Determinación de la glucemia

Se hizo el seguimiento de los niveles de glucemia, tanto en el destete como durante la dieta. Los ratones no presentaron diferencias significativas debidas a la deficiencia de IL-6 adipocitaria en los niveles de glucosa en el destete (fig 4.54).

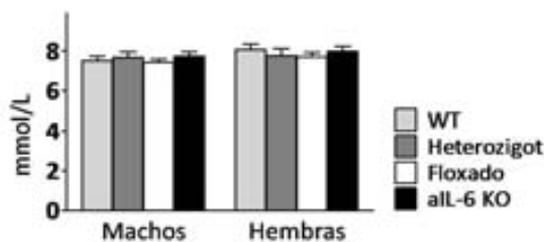


Fig 4.54: Glucosa en el destete. Niveles de glucosa en sangre en el destete, n = 35-50.

Se analizaron los niveles de glucemia al inicio de la dieta, a la semana 2, 6 y 10 (fig 4.55a). También se valoró la glucosa circulante tras un ayuno de 18 horas (fig 4.55c). Los datos de los niveles de glucemia al inicio de la dieta mostraron

Resultados

que no había diferencias entre los grupos. El efecto de la dieta se observó a partir de la segunda semana en el caso de las hembras y a partir de la semana 10 en los machos (fig 4.55b). Por otro lado, la deficiencia de IL-6 adipocitaria, en los machos, no tuvo ningún efecto significativo, exceptuando en los niveles de glucemia después de un ayuno de 18 h donde la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,002$), la descomposición de ésta mostró que el efecto de la dieta era significativo tanto en ratones *wild-type* como en aIL-6 KO, así mismo la deficiencia de IL-6 adipocitaria mostró una tendencia a aumentar la glucemia en los animales alimentados con dieta control (fig 4.55c). En el caso de las hembras, éstas se comportaron de una manera más aleatoria por lo que se refiere a los niveles de glucemia. A la semana 2 de dieta la glucemia era menor en las hembras aIL-6 KO que en las hembras *wild-type*, a la semana 6 era mayor y a la semana 10 era igual (fig 4.55b). Después del ayuno de 18 horas las hembras mostraron un aumento significativo con la dieta grasa, pero no hubo efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria (fig 4.55c).

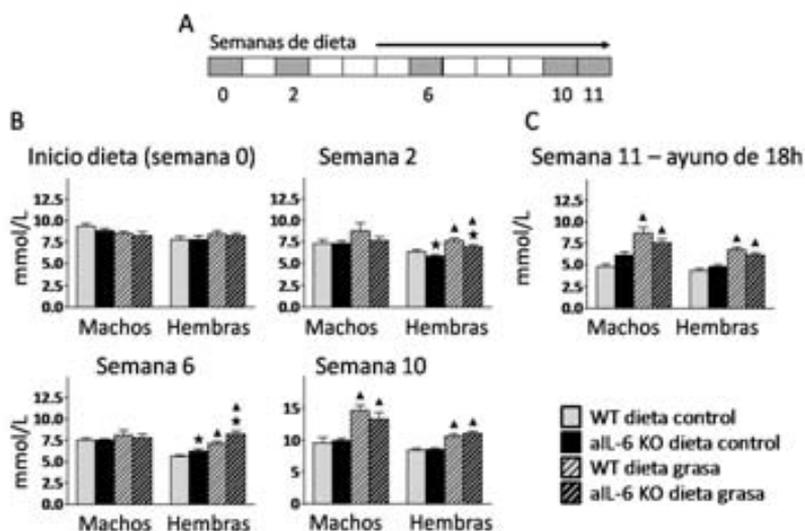


Fig 4.55: Niveles de glucosa circulante. A. Cronograma de las medidas de glucosa realizadas a lo largo del experimento. B. Valores obtenidos a diferentes tiempos. C. Glucemia tras un ayuno de 18h, $n = 9-13$. ▲ y ★ $p < 0,05$ versus dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

4.2.2.5. Test de tolerancia a la Insulina (ITT)

Se realizó un test de tolerancia a la insulina cuyos resultados mostraron que los machos alimentados con dieta grasa desarrollaron intolerancia a la insulina, mientras que en las hembras el efecto fue leve y no significativo (fig 4.56). La deficiencia de IL-6 adipocitaria no tuvo ningún efecto sobre la tolerancia a la insulina en ninguno de los dos sexos.

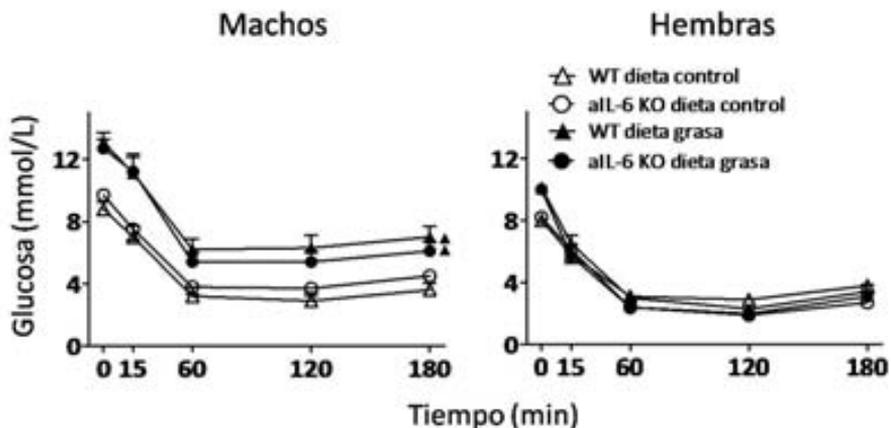


Fig 4.56: Test de tolerancia a la insulina. Test realizado a la semana 10 de dieta donde se inyectó 1,5 U de insulina por kg de ratón, n = 13-29. El efecto del tiempo y la interacción del tiempo y la dieta fue significativo en ambos sexos. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

4.2.2.6. Test de tolerancia a la glucosa oral (OGTT)

En el test de tolerancia a la glucosa oral ambos sexos al ser alimentados con dieta grasa desarrollaron intolerancia a la glucosa (fig 4.57). La deficiencia de IL-6 adipocitaria no tuvo efectos significativos en los machos. Sin embargo, en las hembras aIL-6 KO se observó una interacción significativa del tiempo con la dieta y el genotipo ($p = 0,011$), de forma que con la dieta control, las hembras aIL-6 KO tendieron a presentar una mayor intolerancia a la glucosa en ambas dietas (fig 4.57).

Resultados

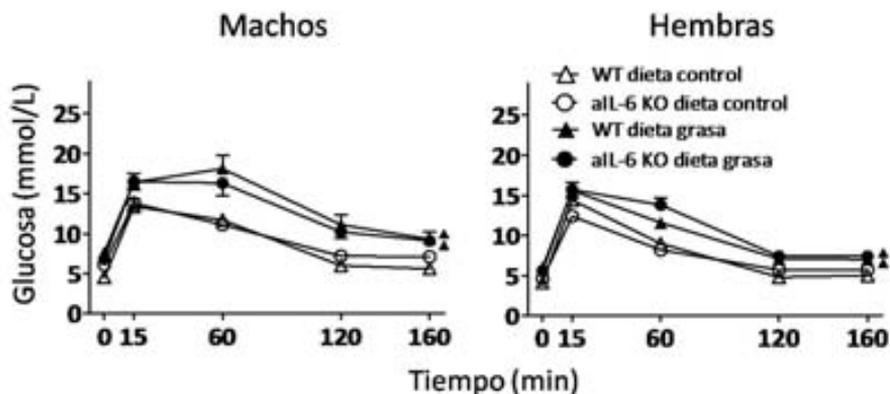


Fig 4.57: Test de tolerancia a la glucosa oral. A la semana 11 de dieta se administró oralmente 2 g de glucosa por kg de ratón, n= 13-24. Tanto el tiempo como la interacción tiempo dieta fue significativa en ambos sexos. En las hembras también fue significativa la interacción tiempo, dieta y genotipo. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

4.2.2.7. Glucógeno hepático

Para saber si la IL-6 de origen adipocitario estaba afectando al almacenamiento de glucosa en el hígado, se evaluaron los niveles de glucógeno hepático en los animales en dieta control y grasa. Ni la deficiencia de IL-6 adipocitaria ni la dieta tuvieron efecto significativo en la acumulación de glucógeno en el hígado (fig 4.58).

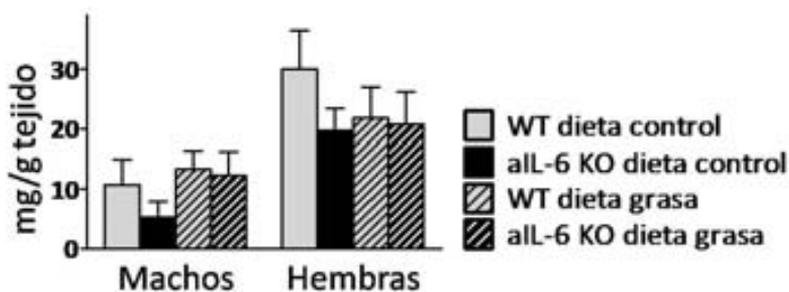


Fig 4.58: Niveles de glucógeno hepático. En machos y hembras a las 13-14 semanas de dieta, n = 3-7.

4.2.2.8. Metabolitos circulantes

Se analizaron los niveles circulantes de varios metabolitos en muestras de sangre obtenidas al realizar la eutanasia de los ratones y en muestras obtenidas a los 15 minutos del inicio de la OGTT.

4.2.2.8.1. Basales

a) Glucosa

Los niveles de glucosa circulante aumentaron con la dieta grasa tanto en machos como en hembras e independientemente de su genotipo. La deficiencia de IL-6 adipocitaria en las hembras causó un aumento significativo de los niveles circulantes de glucosa cuando eran alimentadas con dieta grasa (interacción dieta y genotipo $p = 0,000$) (fig 4.59a).

b) Triglicéridos

Después de 13-14 semanas de dieta los niveles de triglicéridos circulantes aumentaron en las hembras alimentadas con dieta grasa, mientras que en los machos no tuvo efecto. Por otro lado, la deficiencia de IL-6 adipocitaria no afectó a la concentración de triglicéridos circulantes (fig 4.59b)

c) Colesterol

El análisis de los niveles de colesterol circulante mostró un aumento en situación de alimentación con dieta grasa tras 13-14 semanas de dieta e independientemente del sexo. No se observó efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria en la concentración de colesterol circulante (fig 4.59c).

Resultados

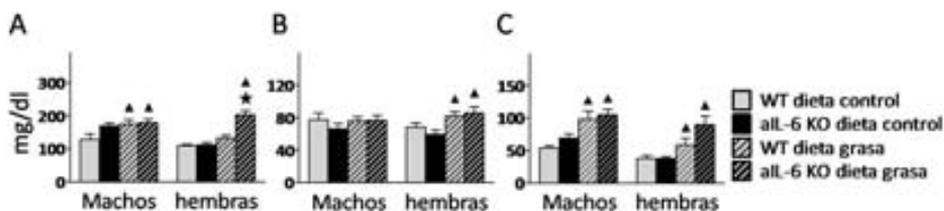


Fig 4.59: Niveles de metabolitos circulantes a las 13-14 semanas de dieta en situación basal. A. Niveles de glucosa, n = 10-18. **B.** Niveles de triglicéridos, n = 11-18. **C.** Niveles de colesterol, n = 10-18. ▲ y ★ p < 0,05 versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

4.2.2.8.2. Tras la administración de glucosa después de un ayuno de 18h

a) Glucosa

Los niveles de glucosa en la muestra obtenida a los 15 minutos del inicio de la OGTT, aumentaron de forma significativa en las hembras alimentadas con dieta grasa, mientras que los machos este efecto no llegó a ser significativo ($p = 0,062$). Con respecto a la deficiencia de IL-6 adipocitaria no se observó efecto en las hembras, mientras que en los machos aIL-6 KO presentaron una tendencia no significativa ($p = 0,052$) a aumentar los niveles de glucosa circulantes (fig 4.60a).

b) Triglicéridos

La deficiencia de IL-6 adipocitaria no afectó a la concentración de triglicéridos circulantes tras la administración de 2g/kg de glucosa oral. En cambio, la dieta grasa causó un aumento de éstos a los 15 minutos de la OGTT en ambos sexos (fig 4.60b).

c) Colesterol

El análisis de los niveles de colesterol circulante mostró un aumento en

situación de alimentación con dieta grasa después de la administración de la glucosa oral tras el ayuno, e independientemente del sexo. No se observó efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria en la concentración de colesterol circulante (fig 4.60c).

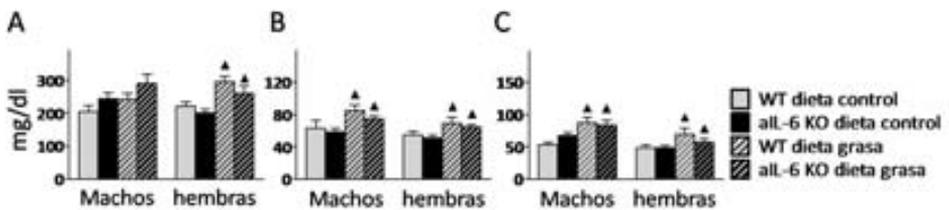


Fig 4.60: Niveles de metabolitos circulantes tras la administración de 2g/kg de glucosa después de un ayuno de 18h (a los 15 minutos del inicio de la OGTT). **A.** Niveles de glucosa, n = 7-17. **B.** Niveles de triglicéridos, n = 7-18. **C.** Niveles de colesterol, n = 7-18. ▲ p < 0,05 versus dieta control.

4.2.2.9. Hormonas

Se analizaron los niveles de insulina a los 15 minutos de la administración de 2g de glucosa por kg de ratón (en la muestra de plasma obtenida durante la OGTT) y los niveles de insulina y leptina tras la eutanasia (a las semana 13 - 14 de dieta).

4.2.2.9.1. Insulina

A los 15 minutos del inicio de la OGTT se tomó una muestra adicional de sangre en la que se midieron los niveles de insulina. Tal y como se esperaba la insulina se incrementó significativamente con la dieta grasa; este aumento fue mayor en los machos que en las hembras. La deficiencia de IL-6 adipocitaria en los machos no mostró ningún efecto, pero en las hembras redujo la subida inducida por la dieta grasa (interacción dieta y genotipo p = 0,028) (fig 4.61).

Resultados

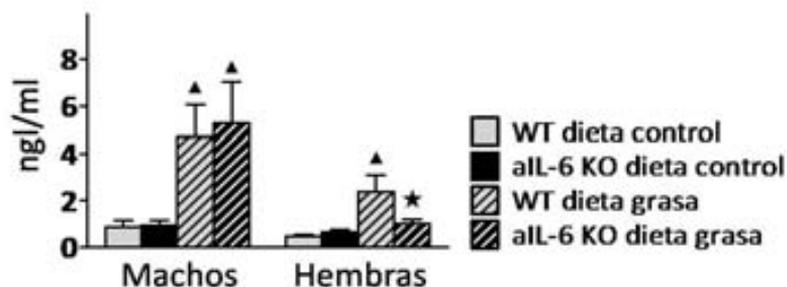


Fig 4.61: Niveles de insulina circulante a los 15 min del inicio de la OGTT, $n = 9-13$. ▲ y ★ $p < 0,05$ versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

El análisis de los niveles de insulina a las 13-14 semanas de dieta mostró un aumento en los ratones alimentados con dieta grasa de ambos sexos. Por otro lado la deficiencia de IL-6 adipocitaria mostró la misma tendencia que en la insulina a los 15 minutos de la OGTT aunque no llegó a ser significativa (interacción dieta y genotipo $p = 0,078$ en las hembras) (fig4.62).

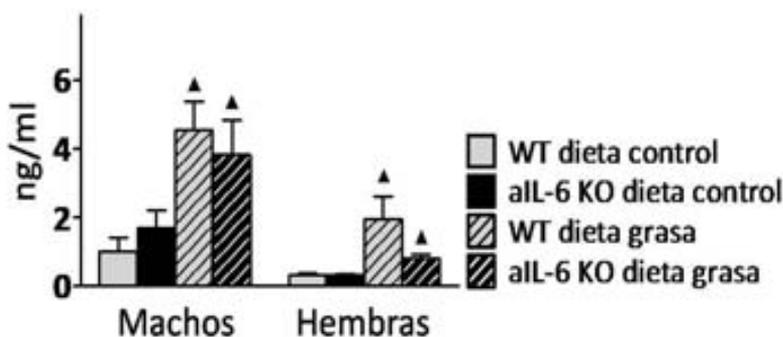


Fig 4.62: Niveles de insulina circulante a las 13-14 semanas de dieta. $n = 6-14$. ▲ $p < 0,05$ versus dieta control.

4.2.2.9.2. Leptina

Los niveles circulantes de leptina estaban aumentados en machos y hembras alimentados con dieta grasa. La deficiencia de IL-6 adipocitaria no tuvo efecto

alguno en éstos (fig 4.63).

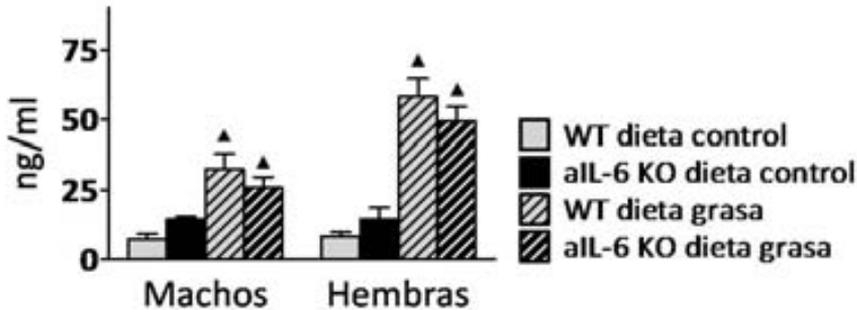


Fig 4.63: Niveles de leptina circulante a las 13-14 semanas de dieta. N = 9-21. ▲ $p < 0,05$ versus dieta control.

4.2.2.10. Expresión génica

En estos animales también se estudió el efecto que podía tener la deficiencia de IL-6 adipocitaria en la expresión de diferentes genes y para ello se usó la técnica de la *real time* qPCR. Este análisis se realizó en el tejido adiposo visceral, el tejido adiposo subcutáneo, el hígado y el músculo esquelético gastrocnemio.

4.2.2.10.1. Genes implicados en el metabolismo de la glucosa

En el hígado se analizó la expresión de los genes *G6pc* y *Pck1*, ambos implicados en la gluconeogénesis. En ambos sexos la dieta grasa produjo una disminución significativa de la expresión de estos genes. Además, en el caso de los machos la deficiencia de IL-6 adipocitaria tuvo un efecto dependiente de la dieta, que fue significativo para el gen *G6pc* (interacción dieta y genotipo $p = 0,000$) y marginalmente significativo para el gen *Pck1* (interacción dieta y genotipo = 0,056). En ambos casos los machos aIL-6 KO presentaron una menor expresión de estos genes cuando estaban alimentados con la dieta control y en el caso del gen *G6pc* no se observó efecto de la dieta grasa en ellos (fig 4.64a).

Resultados

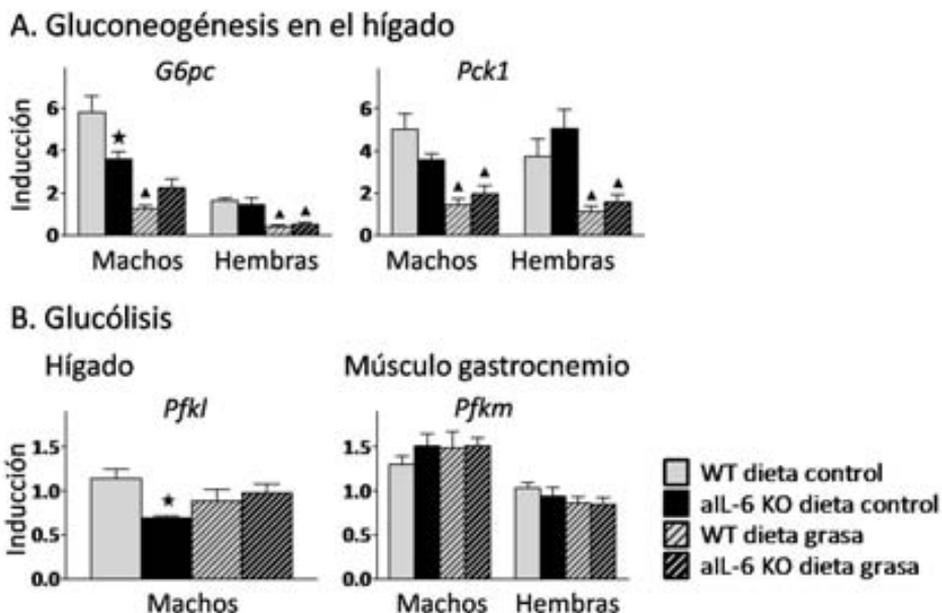


Fig 6.64: Expresión génica implicada en el metabolismo de la glucosa. A. Expresión en el hígado de genes implicados en la gluconeogénesis. **B.** Expresión de genes implicados en la glucólisis en el hígado. **C.** Expresión de genes implicados en la glucólisis en el músculo esquelético, $n = 5-8$. \blacktriangle y \star $p < 0,05$ versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

Otra de las enzimas analizadas en relación con el metabolismo de la glucosa fue la 6-fosfofructoquinasa (PFK), un enzima implicado en la glucólisis. Se analizó la expresión de las isoformas específicas para músculo esquelético e hígado (sólo se analizó en machos). Mientras que en el músculo esquelético no se observaron diferencias significativas ni por efecto de la dieta ni por efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria en ninguno de los sexos (fig 4.64b), en el hígado la interacción de la dieta con el genotipo sí lo fue ($p = 0,004$), y al descomponerla sólo mostró efecto significativo de la deficiencia de IL-6 adipocitaria, que disminuía la expresión de este gen en los ratones alimentados con dieta control (fig 4.64b).

4.2.2.10.2. Genes implicados en el metabolismo de los lípidos

En relación con el metabolismo de los lípidos se analizaron varios genes claves para la síntesis de ácidos grasos como la acetil-CoA carboxilasa (*Acaca*) y la ácido graso sintasa (*Fasn*) en el tejido adiposo visceral y subcutáneo y en el hígado.

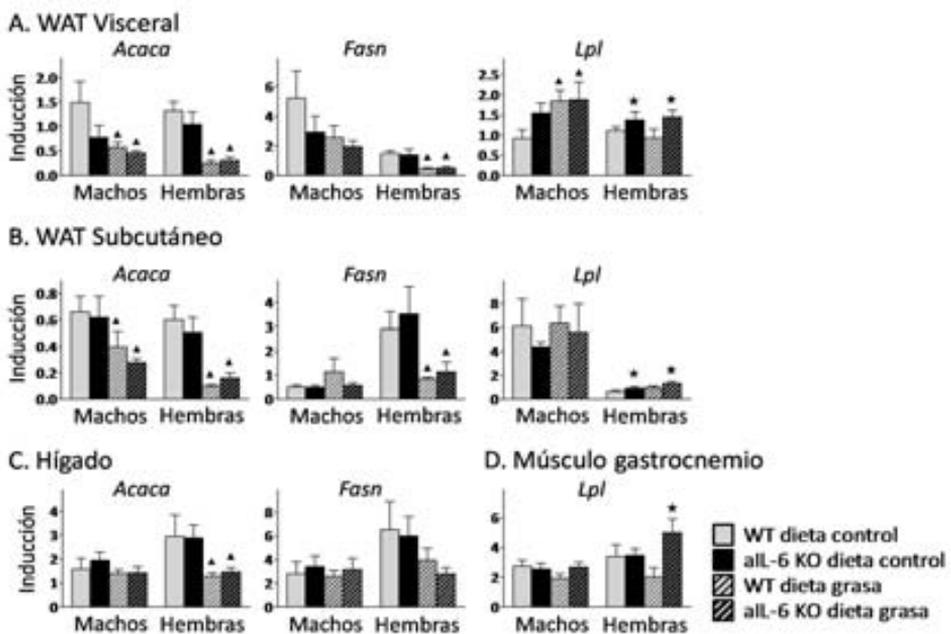


Fig 4.65: Expresión génica implicada en el metabolismo de los lípidos. A. Expresión en el tejido adiposo visceral de genes implicados en el metabolismo de los lípidos. B. Expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo subcutáneo. C. Expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos en el hígado. D. Expresión génica de la LPL en el músculo gastrocnemio, n = 5-8. ▲ y ★ p < 0,05 versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

Tanto en el tejido adiposo visceral como en el tejido adiposo subcutáneo los ratones alimentados con dieta grasa presentaron una disminución en la expresión del gen que codifica para la ACC en ambos sexos (fig 4.65a y 4.65b). En el caso del gen *Fasn* sólo se observó la disminución causada por la dieta grasa en las hembras (fig 4.65a y 4.65b).

Resultados

En el hígado la expresión de estos genes no se vio afectada en el caso de los machos, sin embargo las hembras alimentadas con dieta grasa mostraron una disminución significativa de la expresión del gen *Acaca* y marginalmente significativa ($p=0,051$) en el caso del gen *Fasn* (fig 4.65c).

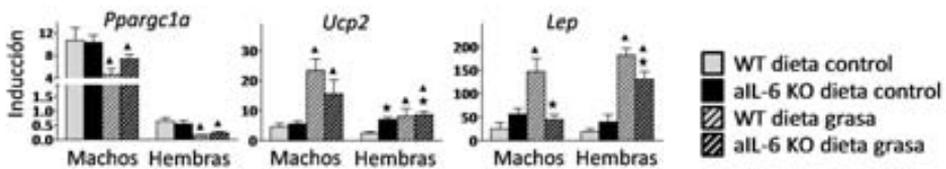
Otro de los genes analizados en relación con el metabolismo de los lípidos fue el gen *Lpl*. La expresión de este gen se analizó en el tejido adiposo visceral, en el tejido adiposo subcutáneo y en el músculo gastrocnemio. En el tejido adiposo visceral este gen presentó un aumento de su expresión por efecto de la dieta grasa únicamente en los machos. Por otro lado, la deficiencia de IL-6 adipocitaria sólo tuvo efecto en las hembras, aumentando la expresión de LPL (fig 4.65a). En el tejido adiposo subcutáneo, no se detectaron cambios en la expresión de este gen en los machos, mientras que en las hembras la deficiencia de IL-6 adipocitaria actuó igual que en el tejido adiposo visceral aumentando su expresión. No se observó efecto de la dieta en ninguno de los sexos (fig 4.65b). En el músculo esquelético, sólo se detectaron cambios en la expresión del gen *Lpl* en las hembras donde la interacción de la dieta con el genotipo fue significativa ($p = 0,028$), y la descomposición de ésta mostró que el efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria era significativo en las hembras alimentadas con dieta grasa, y no se detectó efecto de la dieta (fig 6.65d).

4.2.2.10.3. Otros genes relacionados con el metabolismo

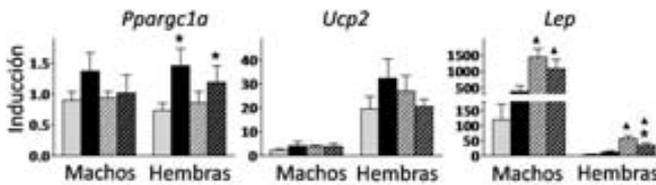
Se analizó la expresión del gen *Ppargc1a* en diferentes tejidos. En el tejido adiposo visceral se observó una disminución de la expresión de éste en los ratones alimentados con dieta grasa de ambos sexos (fig 4.66a). Por otro lado, en el tejido adiposo subcutáneo las hembras aIL-6 KO mostraron una mayor expresión de este gen que las hembras *wild-type* independientemente de la dieta

con la que fueron alimentadas. En el caso de los machos no se detectó ningún efecto significativo (fig 4.66b). Por último, en el hígado y en el músculo gastrocnemio los machos no mostraron cambios en la expresión del gen *Ppargc1a* en ninguna de las situaciones analizadas, mientras que en las hembras, en ambos tejidos, la dieta grasa disminuyó la expresión de este gen y además, la deficiencia de IL-6 adipocitaria mostró un aumento de su expresión (fig 4.66c y 4.66d).

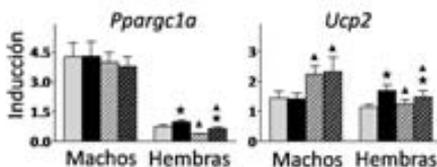
A. WAT Visceral



B. WAT Subcutáneo



C. Hígado



D. Músculo gastrocnemio

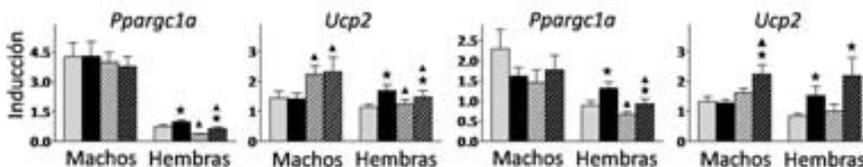


Fig 4.66: Expresión génica de los genes: A. *Ppargc1a*, *Ucp2* y *Lep* en el tejido adiposo visceral. B. *Ppargc1a*, *Ucp2* y *Lep* en el tejido adiposo subcutáneo. C. *Ppargc1a* y *Ucp2* en el hígado. D. *Ppargc1a* y *Ucp2* en músculo gastrocnemio, n = 5-8. ▲ y ★ p < 0,05 versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

La expresión del gen *Ucp2* aumentó con la dieta grasa en el tejido adiposo visceral en ambos sexos, mientras que en el tejido adiposo subcutáneo no tuvo efecto (fig 4.66a y 4.66b). Así mismo la dieta grasa en el hígado sólo tuvo efecto

Resultados

en los machos aumentando su expresión. En el caso del músculo esquelético sólo se vio el efecto de la dieta en los machos, donde la interacción dieta genotipo fue significativa ($p = 0,033$), y al descomponerla se vio que el efecto de la dieta grasa sólo era significativo en los ratones aIL-6 KO alimentados con dieta grasa en los que aumentó la expresión de este gen (fig 4.66d). Por otro lado, las hembras aIL-6 KO mostraron un aumento de la expresión de UCP2 en el tejido adiposo visceral, así como en el hígado y en el músculo gastrocnemio independientemente de la dieta con la que fueron alimentadas (fig 4.66).

En el tejido adiposo visceral y en el tejido adiposo subcutáneo se analizó también la expresión del gen que codifica para la leptina. Tal y como se esperaba en ambos tejidos la dieta produjo un aumento de la expresión de este gen en ambos sexos. En el tejido adiposo visceral la interacción de la dieta con el genotipo fue significativa en ambos sexos ($p = 0,000$ en machos y $p = 0,006$ en las hembras). Al descomponer la interacción se vio que mientras que en las hembras el efecto de la dieta se dio en ambos genotipos, en el caso de los machos sólo fue significativo en los machos *wild-type*. En ambos sexos la descomposición de esta interacción mostró que el efecto significativo de la deficiencia de IL-6 adipocitaria se dio en los ratones alimentados con dieta grasa donde impidió el efecto de la dieta sobre el gen de la leptina (fig 4.66a). En cuanto al tejido adiposo subcutáneo, en las hembras también se dio la interacción de la dieta con el genotipo ($p = 0,040$), al descomponerla se mantuvo el aumento significativo de la expresión de leptina con la dieta grasa en ambos genotipos y además disminuyó de manera significativa el efecto de la dieta sobre su expresión en las aIL-6 KO alimentadas con dieta grasa (fig 4.66b).

4.2.2.10.4. Genes implicados en inflamación

Se analizó la expresión de varios genes implicados en la inflamación como la IL-6, la IL-1 β (interleuquina 1 beta) y el TNF α (factor de necrosis tumoral alfa). El estudio de la expresión del gen que codifica para la IL-6 mostró que ésta estaba disminuida en el tejido adiposo visceral de los ratones aIL-6 KO (fig 4.67a), además, en los machos la dieta produjo un aumento de la expresión de la IL-6 que no llegó a ser significativo ($p = 0,057$). En cambio, en el tejido adiposo subcutáneo, esta disminución sólo se observó de forma significativa en los machos deficientes para la IL-6 adipocitaria donde la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,008$) (fig 4.67a). Por otro lado, en las hembras la interacción dieta genotipo fue significativa ($p = 0,000$) de manera que la descomposición de ésta mostró un aumento significativo de la deficiencia de IL-6 adipocitaria en las hembras alimentadas con dieta control, que no se dio en la dieta grasa donde mostró valores significativamente menores que las *wild-type* (fig 4.67a).

En el hígado se observó una disminución significativa de la expresión de la IL-6 en los ratones aIL-6 KO de ambos sexos. Además, en las hembras la interacción entre la dieta y el genotipo fue significativa ($p = 0,010$), al hacer la descomposición de la interacción el efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria sólo fue significativo en las alimentadas con dieta control, donde disminuyó la expresión del gen de la IL-6 y la dieta grasa sólo disminuyó de manera significativa en las *wild-type* (fig 4.67b). Por lo que respecta al tejido muscular no se observó ningún cambio en la expresión de este gen (fig 4.67c).

Resultados

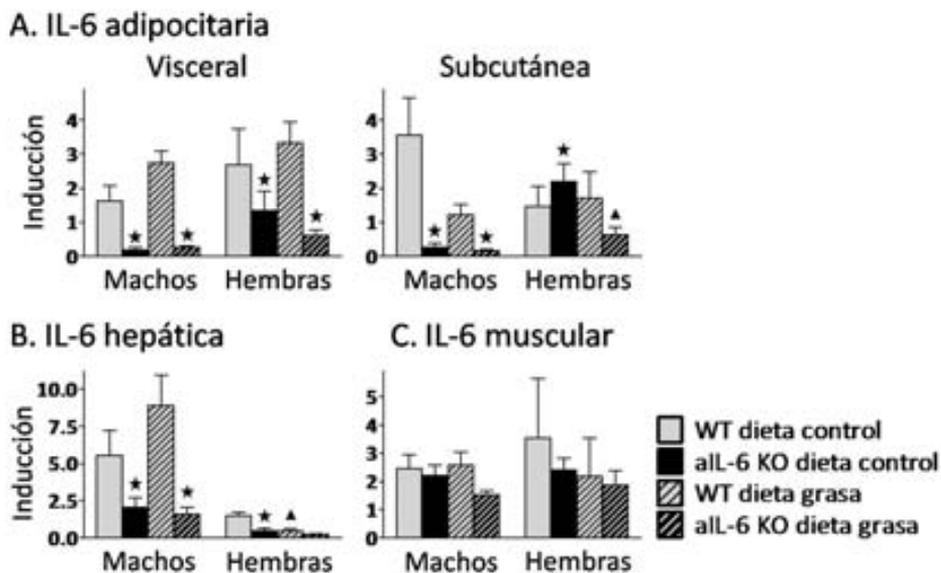


Fig 4.67: Expresión génica de la IL-6. A. Expresión génica de la IL-6 en tejido adiposo visceral y subcutáneo. B. Expresión génica de la IL-6 en hígado. C. Expresión génica de la IL-6 en músculo esquelético, n = 5-8. ▲ y ★ p < 0,05 versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

Otra interleuquina analizada fue la IL-1 β . Se observó una disminución del gen que codifica para ella en el tejido adiposo visceral debida a la dieta grasa en ambos sexos (fig 4.68a). Por otro lado, el tejido adiposo subcutáneo no mostró cambios en la expresión de este gen en ninguna de las situaciones analizadas (fig 4.68a).

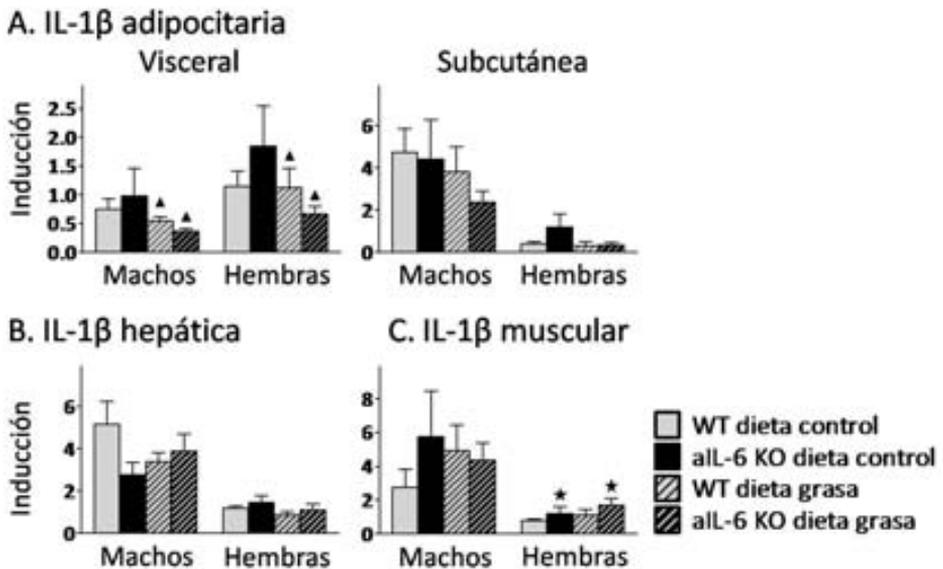


Fig 4.68: Expresión génica de la IL-1 β . A. Expresión génica de la IL-1 β en tejido adiposo visceral y subcutáneo. B. Expresión génica de la IL-1 β en hígado. C. Expresión génica de la IL-1 β en músculo esquelético, $n = 5-8$. \blacktriangle y \star $p < 0,05$ versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

En el hígado tampoco se observaron diferencias en la expresión del gen de la IL-1 β (fig 4.68b). Por lo que se refiere al músculo esquelético, los machos no presentaron variaciones en la expresión del gen de la IL-1 β , en cambio, las hembras aIL-6 KO mostraron un aumento significativo de la expresión de éste en ambas dietas (fig 4.68c).

El análisis de la expresión del gen que codifica para el TNF α en el tejido adiposo visceral mostró que la interacción de la dieta y el genotipo era significativa ($p = 0,000$), los machos aIL-6 KO alimentados con dieta control tenían una mayor expresión de TNF α que los machos *wild-type* y con la dieta grasa pasó lo contrario dándose un aumento significativo con la dieta grasa únicamente en los ratones *wild-type* (fig 4.69a). Las hembras, aunque mostraron unas tendencias parecidas a los machos, ninguna de ellas fue significativa (fig 4.69a). En el caso

Resultados

del tejido adiposo subcutáneo, en los machos no se observaron diferencias en la expresión de este gen, mientras que en las hembras la descomposición de la interacción de la dieta y genotipo ($p = 0,002$) mostró un aumento de la expresión de TNF α en las hembras aIL-6 KO alimentadas con dieta control que no se dio en las alimentadas con dieta grasa (fig 4.69a).

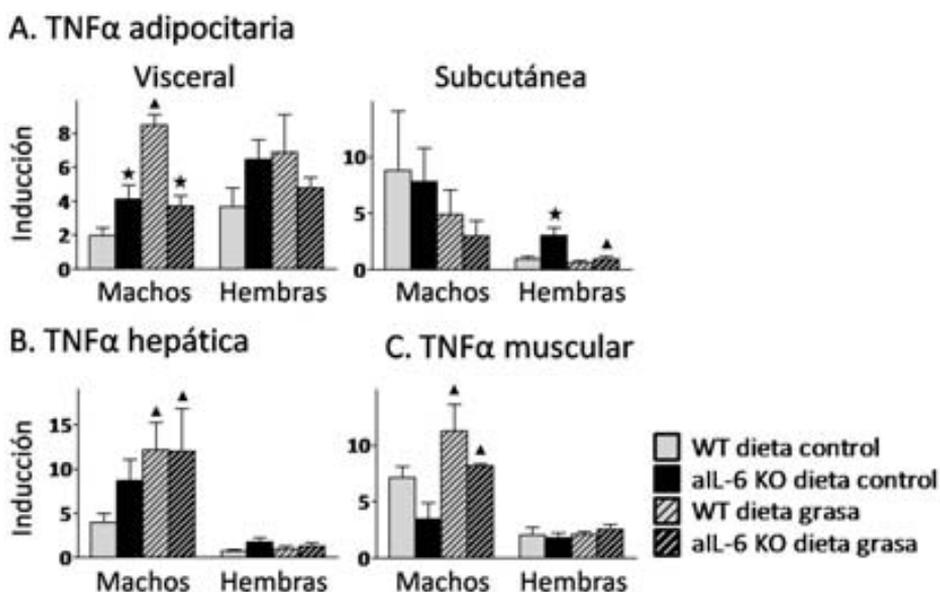


Fig 4.69: Expresión génica de la TNF α . A. Expresión génica del TNF α en tejido adiposo visceral y subcutáneo. B. Expresión génica del TNF α en hígado. C. Expresión génica del TNF α en músculo esquelético, $n = 5-8$. \blacktriangle y \star $p < 0,05$ versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

Los machos alimentados con dieta grasa presentaron un aumento de la expresión del gen que codifica para el TNF α tanto en el hígado como en el músculo esquelético. En cambio en las hembras no hubo diferencias significativas en la expresión de este gen en ninguno de estos tejidos (fig 4.69b y 4.69c).

También se analizaron dos genes relacionados con la infiltración de macrófagos, el gen *Emr1* y el gen *Ccl2*. El gen *Emr1*, que codifica para el F4/80, marcador de macrófagos maduros, estaba aumentado en el tejido adiposo

subcutáneo de los ratones alimentados con dieta grasa de ambos sexos (fig 4.70b). En el tejido adiposo visceral en los machos la interacción de la dieta y el genotipo fue significativo ($p = 0,008$) y al descomponerla la deficiencia de IL-6 adipocitaria sólo tuvo efecto en los machos alimentados con dieta grasa donde disminuyó el efecto de la dieta sobre la expresión de *Emr1*, la dieta aumentó significativamente su expresión únicamente en los ratones *wild-type*. En el caso de las hembras la interacción de la dieta con el genotipo también fue significativa ($p = 0,004$), en esta ocasión la descomposición de la interacción sólo mostró un aumento significativo de la expresión de este gen en las hembras *wild-type* alimentadas con dieta grasa (fig 4.70a).

En el hígado la dieta grasa produjo un aumento de la expresión del gen *Emr1* en los machos, mientras que en las hembras ni la dieta ni la deficiencia de IL-6 adipocitaria tuvieron efecto (fig 4.70c). Este gen también se analizó en el músculo esquelético donde se observó un aumento con la dieta grasa que sólo fue significativo en los machos (fig 4.70d).

El análisis del gen *Ccl2*, que codifica para la MCP1, una quimioproteína atrayente de macrófagos, mostró un aumento de su expresión en el tejido adiposo visceral de las hembras alimentadas con dieta grasa. En el caso de los machos la interacción de la dieta y el genotipo fue significativa en este tejido ($p = 0,007$), y la descomposición de ésta mostró que el efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria sólo era significativo en los machos alimentados con dieta grasa, disminuyendo el efecto de la dieta grasa (fig 4.70a). En el caso del tejido adiposo subcutáneo, en los machos no se observaron diferencias en la expresión de este gen, sin embargo, en las hembras la dieta grasa aumentó su expresión, de la misma manera la deficiencia de IL-6 adipocitaria en las hembras aumentó la

Resultados

expresión del gen *Ccl2*, aunque ésta no llegó a ser significativa ($p = 0,051$) (fig 4.70b).

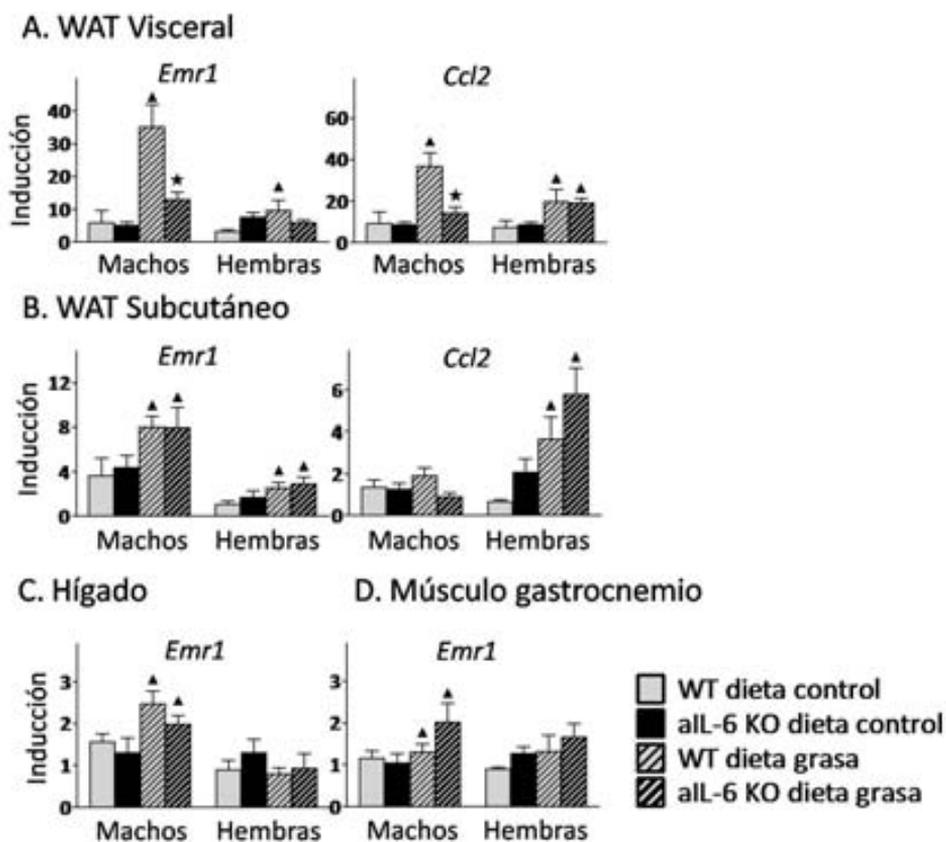


Fig 4.70: Expresión génica implicada en inflamación. A. Expresión génica de la *Emr1* y *Ccl2* en tejido adiposo visceral. B. Expresión génica de la *Emr1* y *Ccl2* en tejido adiposo subcutáneo. C. Expresión génica de la *Emr1* en hígado. D. Expresión génica de *Emr1* en músculo gastrocnemio, $n = 5-8$. ▲ y ★ $p < 0,05$ versus el grupo correspondiente de dieta control y ratones *wild-type*, respectivamente.

5. Discusión

5. Discusión

5.1. *Knock-out* condicionales para la IL-6 en músculo esquelético y tejido adiposo

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica con importantes funciones en el sistema inmune. Esta citoquina también que está implicada en múltiples funciones en diferentes órganos. De esta forma la IL-6 tiene un importante papel en el sistema nervioso central (SNC), tanto en los procesos de neuroinflamación como en la homeostasis normal del tejido (Spooren et al., 2011). Diversos estudios han demostrado que la IL-6 podría tener un papel en el control del peso corporal, especialmente a nivel del SNC (De Benedetti et al., 1997; Franckhauser et al., 2008; Hidalgo et al., 2010; Li et al., 2002; Lieskovska et al., 2002; Sadagurski et al., 2010; Wallenius et al., 2002a; Wallenius et al., 2002b) aunque existe cierta controversia en la bibliografía (Di Gregorio et al., 2004; Mooney, 2007; Pedersen et al., 2007). La IL-6 puede realizar estos efectos tanto a nivel de SNC como periférico, aunque no está claro si la IL-6 endógena que participa en la regulación del peso corporal a nivel del SNC procede del mismo SNC o bien de la periferia. Hay varios trabajos donde la administración sostenida de IL-6 a nivel de sistema nervioso central produce una disminución del peso corporal (Li et al., 2002; Wallenius et al., 2002a). Por otro lado, estudios con ratones transgénicos donde la expresión mantenida de IL-6 (Franckhauser et al., 2008; Lieskovska et al., 2002) en la periferia produce un aumento de IL-6 en suero, muestran también una disminución del peso corporal de esos animales, apoyando la idea del posible papel de la IL-6 circulante en el control del peso corporal. La función de la IL-6 secretada por tejidos periféricos de tipo no inmunológicos podría tener un papel importante y esto es actualmente motivo de debate.

Discusión

En la última década se ha puesto de relevancia la capacidad del músculo esquelético de secretar mioquinas (Pedersen, 2011; Pedersen and Febbraio, 2008; Trayhurn et al., 2011). La IL-6 es la principal mioquina producida (Jonsdottir et al., 2000; Ostrowski et al., 1998) y liberada (Steensberg et al., 2000) por el músculo esquelético. Esta citoquina es producida por los mioblastos en contracción (Steensberg et al., 2000) por lo que se ha postulado que podría ser un factor que media los efectos del ejercicio a nivel metabólico (Pedersen et al., 2003). También se ha demostrado que la IL-6 juega un importante papel en el crecimiento hipertrófico del músculo esquelético (Serrano et al., 2008). El músculo esquelético no es el único capaz de secretar IL-6, el tejido adiposo también la produce y secreta (Galic et al., 2010; Rajala and Scherer, 2003; Trayhurn and Beattie, 2001; Trayhurn et al., 2011). Este tejido es la principal fuente de IL-6 en situaciones no inflamatorias y está descrito que los niveles de esta citoquina en plasma se correlacionan con la masa de grasa corporal (Bastard et al., 2002; Mohamed-Ali et al., 1997).

Dado que el músculo esquelético y el tejido adiposo, además de ser una de las fuentes principales de producción de IL-6 a nivel periférico, juegan un papel importante en el metabolismo, nos planteamos delectar la expresión de esta citoquina de manera específica en estos tejidos. Para ello desarrollamos mediante el uso de la tecnología Cre/lox (Ghosh and Van Duyne, 2002; Kos, 2004), dos modelos de *knock-out* condicionales para la IL-6: uno en el músculo esquelético y el otro en el tejido adiposo.

El *knock-out* condicional para la IL-6 en músculo esquelético mostró las distribuciones mendelianas esperadas tanto para el genotipo como para el sexo. La expresión de mRNA de IL-6 únicamente estaba disminuida de manera significativa en el músculo esquelético de estos ratones. Las pruebas de los test sensorimotrices

(Crawley, 1999; Fujimoto et al., 2004) realizadas para detectar si la deficiencia de IL-6 muscular afectaba a las habilidades motoras de estos ratones, no mostraron ninguna alteración motora. En cambio, en el test de *rotarod* se observó que la deficiencia de IL-6 en el músculo esquelético mejoraba la realización del test, ya que estos animales mostraban menos caídas y mayores tiempos de latencia en el aparato que los controles. Estos datos resultan curiosos ya que sugieren que la delección de IL-6 muscular estaría dando una ventaja motora a estos animales. En trabajos realizados por la Dra Pura Muñoz y el Dr Antonio Serrano de la universidad Pompeu Fabra demostraron en ratones IL-6 KO totales que la IL-6 producida por las células madre y las fibras musculares era una de las principales controladoras del crecimiento compensatorio de este tejido en respuesta a una sobrecarga mecánica (Serrano et al., 2008). Este trabajo fue realizado en animales en los que ninguno de sus tejidos producía IL-6 funcional, por lo que parecía interesante saber el papel que jugaba la IL-6 producida por el músculo esquelético en el crecimiento y en la regeneración de este tejido. Datos preliminares obtenidos por el Dr Antonio Serrano, en colaboración con nosotros, mostraron que en condiciones normales los ratones mL-6 KO presentaban fibras musculares con núcleos centrales, que es un síntoma de daño muscular intrínseco (Arnold et al., 2007; Charge and Rudnicki, 2004). En el caso del contenido de colágeno, que aumenta tras la realización de un ejercicio físico intenso y tras una lesión muscular y que disminuye a medida que el tejido se regenera (Koskinen et al., 2001; Myllyla et al., 1986) se observó que la deficiencia muscular de IL-6 sólo tuvo efecto en los machos que presentaban una menor cantidad de colágeno. La IL-6 podría tener un papel en el mantenimiento y la estabilidad del músculo esquelético. El hecho de que realicen mejor el test de *rotarod* podría indicar que la IL-6 podría tener efectos a diferentes niveles (músculo, SNC...) sobre la actividad motora.

El *knock-out* condicional para la IL-6 en tejido adiposo se trataba de un *knock-out*

Discusión

inducible así que el estudio de la distribución mendeliana para el genotipo se realizó analizando por separado la IL-6 y la recombinasa Cre. La distribución mendeliana para el gen de la IL-6 mostró la ratio esperada. En el caso del gen de la recombinasa Cre se obtuvieron un mayor número de animales positivos de lo esperado. Este aumento en el número de ratones Cre positivos probablemente sea fruto de la casualidad, ya que cuando se analizan las ratio obtenidas la primera vez que se obtuvieron los animales y la segunda vez se observa que no es un dato consistente. Por lo que se refiere a la distribución de sexos estos siguieron la ratio esperada. El análisis de la expresión de IL-6 mostró que estaba disminuida significativamente en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de los machos. En las hembras esta disminución no fue tan clara, especialmente en el tejido adiposo subcutáneo. Por otro lado, en otros tejidos, como en el caso del músculo gastrocnemio, no se observaron diferencias en la expresión de IL-6 entre los genotipos, pero sorprendentemente en el hígado si se observó que los ratones aIL-6 mostraban un descenso en la disminución de la IL-6. Dado que en el análisis por PCR convencional en este tejido no se detectó la banda correspondiente al gen de la IL-6 delecionado, esto sugiere que la disminución en la expresión de IL-6 hepática podría ser debida a algún factor externo que está alterado en el caso de los ratones *knock-out* condicionales para la IL-6 en el tejido adiposo. El hígado recibe señales del tejido adiposo visceral, entre ellas la IL-6 que podría tener un papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Eder et al., 2009; Hoene and Weigert, 2008; Lee et al., 2009a; Shoelson et al., 2007; Wellen and Hotamisligil, 2005) es tentador pensar que la disminución en la expresión de IL-6 en el tejido adiposo, especialmente en el visceral, pueda de alguna manera afectar a la expresión de IL-6 en el hígado, quizás a través de cambios en algún factor endocrino que llegaría al hígado a través de la circulación portal (Shoelson et al., 2007). Por otro lado, está descrito que aP2 también se expresa en macrófagos (Wang et al., 2010), y dado el papel que juegan estos en el desarrollo de la obesidad y de la resistencia a la insulina (Kanda et al.,

2006) sería interesante obtener macrófagos de estos animales y estudiar la expresión de IL-6 en ellos.

5.2. Peso corporal: obesidad inducida por dieta

Tal y como se esperaba las dietas ricas en grasa causaron obesidad en todos los experimentos realizados. La deficiencia de IL-6 muscular tuvo un efecto sexo dependiente en el peso de los animales, que fue exacerbado por la dieta grasa. Los machos mIL-6 KO eran resistentes a la obesidad, mientras que las hembras eran más sensibles a ésta y engordaban más que las hembras floxadas.

En la longitud de las tibias la deficiencia de IL-6 muscular no mostró ningún efecto, lo que sugiere que estos animales no tienen ninguna alteración en el crecimiento (Baltgalvis et al., 2008; Mounier et al., 2009). Por lo que respecta al peso absoluto del músculo tibialis, éste tendió a incrementarse con la dieta grasa aunque sólo fue significativo en los machos. El aumento en la relación entre el peso absoluto del músculo tibialis y la longitud de la tibia observada en los ratones alimentados con dieta grasa (Shirayev et al., 2009) así como el peso relativo del músculo tibialis, nos sugiere que este aumento podría deberse a la acumulación de lípidos en el músculo.

El tipo de fibras musculares está asociado con obesidad y diabetes, y que está descrito que en pacientes obesos y en diabéticos presentan una disminución de las fibras oxidativas y un aumento de las fibras glicolíticas (Lillioja et al., 1987; Tanner et al., 2002; Wang et al., 2004) el Dr Antonio Serrano, en colaboración con nosotros, estudió el porcentaje y el tamaño de las fibras en los ratones mIL-6 KO en dieta grasa en el músculo tibialis. Así, datos obtenidos por el Dr Serrano en estos ratones no

Discusión

mostraron efecto ni de la deficiencia de IL-6 muscular ni de la dieta en el porcentaje de fibras oxidativas del músculo tibialis. Cuando se estudió el tamaño de las fibras se vio efecto de la deficiencia de IL-6 muscular en las hembras, únicamente en las alimentadas con dieta control en las que disminuyó, y en el caso de los machos en los alimentados con dieta grasa donde también se vio una disminución del tamaño de las fibras lo que podría estar relacionado con la resistencia a desarrollar obesidad de estos animales.

Dado que no se observó una alteración del crecimiento, podría ser que las variaciones en el peso fueran debidas a cambios en los depósitos de grasa, aunque se hacen necesarios más estudios para confirmar esto, como tinciones de grasa o realizar la estimación del porcentaje de grasa corporal por absorciometría de rayos X de energía dual (DXA).

Al analizar el peso del tejido adiposo visceral y del tejido adiposo subcutáneo se observó que estaban afectados por la dieta y por la deficiencia de IL-6 de una manera muy parecida a como estaba afectado el peso corporal de estos ratones: mayores en los ratones que habían desarrollado obesidad que en los controles, mientras que la deficiencia de IL-6 muscular limitó el efecto de la dieta en los machos y lo potenció en las hembras. El peso del tejido adiposo marrón se comportó de una forma muy parecida al tejido adiposo visceral y subcutáneo. En el caso del peso absoluto del hígado la deficiencia de IL-6 muscular no tuvo ningún efecto. En resumen, el peso de estos tejidos se correlaciona con el peso corporal de estos ratones, lo que sugiere que los cambios observados en el peso corporal de éstos podrían ser debidos principalmente a cambios en la acumulación de grasas.

El análisis del tamaño y el número de adipocitos (Lemonnier, 1972) en el tejido adiposo visceral, así como en el tejido adiposo subcutáneo, nos permitió dilucidar las

causas de las diferencias en el peso de estos tejidos. Cuando se compararon los ratones mL-6 KO con su control más adecuado, los floxados, se observó que la deficiencia de IL-6 muscular no tuvo efecto en el número de adipocitos en ninguno de los sexos. En cuanto al tamaño de los adipocitos había un claro efecto de la dieta, ya que estas células eran más grandes en los ratones alimentados con dieta grasa. La deficiencia de IL-6 afectó al tamaño de los adipocitos en ambos tejidos de manera sexo dependiente, disminuyendo el tamaño en los machos deficientes en IL-6 muscular y al revés en las hembras. Podemos concluir que los cambios observados en el tejido adiposo visceral y subcutáneo se deben principalmente a cambios en el tamaño de los adipocitos y no a cambios en el número de células, lo que sugiere que las diferencias observadas en el peso de estos tejidos, y por consiguiente en el peso corporal de estos ratones, son debidas a la acumulación de lípidos.

Una de las características de las dietas grasas es la deposición de lípidos en el hígado, lo que se conoce como esteatosis hepática (Buettner et al., 2006; Jump, 2011; Lieber et al., 2004; Samuel et al., 2004; Westerbacka et al., 2005). Tal y como se esperaba la dieta grasa produjo acumulación de lípidos en el hígado. La deficiencia de IL-6 muscular revertió la esteatosis hepática en los machos. Esto está en contraposición con datos observados en la bibliografía en los que diferentes modelos de inducción de esteatosis hepática en ratones consiguen una disminución del acúmulo de lípidos en el hígado tras la administración de IL-6 (Hong et al., 2004). En concordancia con estos datos el bloqueo de la señalización de IL-6 produce un empeoramiento de la esteatosis hepática (Yamaguchi et al., 2010). Sin embargo, la administración de infliximab, un inhibidor del TNF α , que produce una disminución de marcadores proinflamatorios (TNF α , IL-1 β y IL-6) en el hígado de ratas alimentadas con dieta grasa y causa la reducción de la esteatosis (Barbuio et al., 2007). En esta línea, ratones deficientes en IL-6 total con esteatosis inducida por dieta grasa

Discusión

presentan un fenotipo menos severo (Mas et al., 2009). Nuestros datos, por tanto, apoyarían estos últimos estudios que proponen que la IL-6 contribuiría al desarrollo de la esteatosis hepática.

En el caso del experimento de deficiencia de IL-6 adipocitaria los ratones alimentados con dieta grasa, tal y como se esperaba también desarrollaron obesidad. La deficiencia de IL-6 adipocitaria afectó al peso de manera sexo dependiente, pero en esta ocasión las hembras aIL-6 KO eran resistentes a la obesidad inducida por dieta grasa. En el caso de los machos, la deficiencia de IL-6 adipocitaria mostró la misma tendencia aunque no llegó a ser significativa. Por lo que respecta al crecimiento de estos animales, la deficiencia de IL-6 adipocitaria no causó cambios ni en la longitud de la tibia ni en el peso del músculo tibialis, así como tampoco en la relación entre ellos, por lo que en estos ratones la IL-6 no parecía estar alterando el crecimiento. También se analizó el peso del tejido adiposo visceral y del tejido adiposo subcutáneo, así como del tejido adiposo marrón con la finalidad de determinar si estaban implicados en los cambios en el peso corporal. La dieta grasa produjo un aumento del peso de estos tejidos, mientras que la deficiencia de IL-6 adipocitaria tendió a disminuir el peso del tejido adiposo visceral y subcutáneo de los animales alimentados con dieta grasa, aunque no llegó a ser significativo.

Tanto en el tejido adiposo visceral como en el subcutáneo se analizó el tamaño y el número de adipocitos. En ambos tejidos, la dieta grasa produjo un aumento del tamaño de estas células en ratones de ambos sexos consistente con el peso. Con respecto al número de adipocitos, en el caso del tejido adiposo subcutáneo la deficiencia de IL-6 adipocitaria no mostró efecto en ninguno de los sexos. En cambio, en el tejido adiposo visceral llama la atención el hecho de que la deficiencia de IL-6 adipocitaria afectó al número de adipocitos de manera sexo dependiente,

aumentándolo en los machos a y reduciéndolo en las hembras. Podría ser que la IL-6 tuviera un papel en la proliferación y/o diferenciación de las células del linaje adipocitario de este tejido (Fajas, 2003). En resumen, la dieta grasa no tiene el mismo efecto en el tamaño y número de adipocitos en los diferentes tejidos adiposos ni tampoco actúa igual en ambos sexos (Lemonnier, 1972). Los cambios observados en el número y tamaño de los adipocitos podrían explicar el peso de los depósitos de grasa, pero en esta ocasión los cambios en el peso de estos tejidos, aunque se aproximan bastante, no acababan de reflejar los cambios en el peso corporal, por lo que probablemente la acumulación de grasa o cambios en otros tejidos ayudarían a explicar los cambios en el peso corporal.

La dieta grasa no sólo produjo un aumento del peso absoluto del hígado sino que también causó esteatosis hepática. La deficiencia de IL-6 adipocitaria sólo tuvo efecto en las hembras, que mostraron hígados más pequeños y con una menor tendencia a acumular lípidos. En esta ocasión este tejido sí que reflejó los cambios en el peso corporal de los ratones. Esto estaría en concordancia con los datos obtenidos con los ratones machos deficientes en IL-6 muscular, sugiriendo que la esteatosis hepática podría estar relacionada con el estado inflamatorio que se da durante la obesidad.

En conclusión, los cambios en el peso de los depósitos de grasa no son suficientes para explicar los cambios en el peso corporal, por lo que probablemente haya cambios en otros tejidos, como se observa en el caso del hígado en el que se da un aumento tanto del peso como de la acumulación de grasas. Es posible que estos cambios no sólo se den en el hígado por lo que resultaría interesante estudiar el efecto de la dieta en otros tejidos como en el músculo esquelético.

Discusión

5.3. Ingesta

Se analizó la ingesta de estos ratones para saber si los cambios de peso observados eran debidos a la cantidad de dieta que comían. En todos los experimentos realizados, los ratones alimentados con dieta grasa ingerían menos comida, pero al realizar el análisis de las calorías ingeridas, resultaba que estaban ingiriendo un mayor número de calorías que los ratones alimentados con la dieta control, lo que explicaría el aumento de peso de los ratones que desarrollaron obesidad.

En el caso de los ratones mL-6 KO, las diferencias en la ingesta debidas a la deficiencia de IL-6 muscular en los gramos de comida y en el número de calorías ingeridas por estos animales no eran suficientes como para explicar por sí solas los cambios observados en el peso corporal. El análisis de la eficiencia de la dieta (Magee, 1962; Malik, 1984) mostró que la dieta grasa era más eficiente en la ganancia de peso que la dieta control y, únicamente en los machos, los ratones con deficiencia de IL-6 muscular presentaron una menor eficiencia alimentaria. Estos ratones, aunque ingieren la misma cantidad de comida e incluso un número similar de calorías, tienen una menor capacidad de transformar la comida en peso corporal.

En el modelo de deficiencia de IL-6 adipocitaria, la ingesta no muestra diferencias que puedan explicar la resistencia a la obesidad de las hembras deficientes en IL-6 adipocitaria. Además, en todos los casos la dieta fue igual de eficiente a la hora de transformar la comida en peso. En este modelo, la dieta por sí sola tampoco explica las diferencias observadas en el peso corporal.

5.4. Control central de la ingesta. Neuropeptidos hipotalámicos y leptina

Hay una serie de evidencias que sugieren que algunos de los efectos metabólicos de la IL-6 podrían estar mediados a nivel del SNC. Se ha descrito la presencia del receptor de la IL-6 en diferentes áreas del hipotálamo implicadas en el control de la ingesta y del gasto metabólico (Benrick et al., 2009; Ropelle et al., 2010; Schele et al., 2012). Otros trabajos muestran cambios en la expresión de péptidos hipotalámicos con funciones relacionadas con el control de la homeostasis energética, tanto en ratones con deficiencia de IL-6 total (Benrick et al., 2009), como en ratones con una expresión sostenida de IL-6 en el SNC (Senaris et al., 2011). Todos estos datos sugieren que la IL-6 podría estar regulando el balance energético actuando directamente sobre los núcleos hipotalámicos que estarían implicados en estas funciones.

Ratones con deficiencia total de IL-6 viejos, de unos 8 a 11 meses de edad, muestran una disminución de la expresión de hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular (PVN) (Benrick et al., 2009). Por el contrario, animales de la misma edad con una expresión sostenida de IL-6 en el cerebelo muestran un aumento de la expresión de este neuropeptido (Senaris et al., 2011). En el análisis de la expresión de neuropeptidos en nuestros dos modelos de deficiencia de IL-6, realizados en colaboración con nosotros por el grupo de la Dra Rosa Señarís de la Universidad de Santiago de Compostela, se observa que la disminución de IL-6 en la circulación sanguínea, tanto por la delección de IL-6 en el músculo esquelético como en el tejido adiposo, tal y como pasaba en la deficiencia total de IL-6, una disminución de la expresión de CRH, lo que podría indicar una posible acción de la IL-6 circulante en las neuronas productoras de CRH en el PVN del hipotálamo. El CRH tiene tanto efectos anorexigénicos como termogénicos (Heinrichs and Richard, 1999; Richard et al., 2002), y está descrito que actúa sobre el sistema nervioso simpático, activándolo y

Discusión

produciendo la estimulación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (Richard et al., 2002).

En ambos modelos de deficiencia de IL-6 en la periferia observamos que la expresión de neuropéptidos variaba entre sexos. En el caso de la deficiencia de IL-6 muscular esta expresión se correlacionaba bastante bien con el peso de los animales. De esta manera, los machos mostraron aumentada la expresión de péptidos con capacidad de activar el gasto energético e inhibir la ingesta, como la proopiomelanocortina (POMC) en el núcleo arcuato (Saper et al., 2002; Woods and D'Alessio, 2008), y disminuidos los péptidos que inhiben el gasto energético y aumentan la ingesta, como el neuropéptido Y (NPY), el balance del cual hace suponer que estos ratones tendrían una menor ingesta y/o una mayor actividad o un metabolismo más activo. Por el contrario, las hembras deficientes en IL-6 muscular presentaron el cuadro inverso, con un aumento de la expresión de los péptidos que señalizan para el descenso del gasto energético (NPY, preproorexina (ppOX) y proteína relacionada con agoutí (AgRP)) y a la vez presentan una disminución de los péptidos que incrementan el gasto energético (POMC y CRH), lo que daría como resultado que las hembras tendrían una mayor ingesta y/o una menor actividad o un metabolismo más reducido. El hecho de que no se observen diferencias en la ingesta que expliquen el peso corporal de estos ratones sugiere que los neuropéptidos, que se han analizado, realizarían su función principalmente en el control del gasto energético y no tanto en el control de la ingesta. Al someter a estos animales al test de *hole board*, éste mostró una mayor actividad en los machos con deficiencia de IL-6 muscular y una menor actividad en las hembras con deficiencia de IL-6 muscular, lo que apoyaría la idea de que los neuropéptidos realizarían su función controlando el gasto energético principalmente.

En el caso de la deficiencia de IL-6 adipocitaria, aunque en dieta control no se vieron diferencias significativas en el peso de estos animales, el estudio de los neuropéptidos mostró efectos sexo dependientes. Al igual que pasó con la deficiencia de IL-6 muscular, el estudio de la ingesta no mostraba ninguna alteración significativa, por lo que en este modelo suponemos que los neuropéptidos analizados también ejercen su papel controlando el gasto energético. Las hembras alimentadas con dieta control presentaron un perfil de neuropéptidos que indicaba un balance energético negativo (presentaban una disminución de AgRP, NPY y de la ppOX). Por el contrario, en los machos la deficiencia de IL-6 adipocitaria reflejaba un estado de inhibición del gasto energético (aumento de AgRP y NPY).

En el modelo de deficiencia de IL-6 en músculo esquelético, el grupo de la Dra Señarís analizó también los ratones en la situación de alimentación con dieta grasa. En general la dieta grasa altera el patrón de expresión observado en los animales alimentados con dieta control. Así, en ambos sexos la dieta grasa causa una disminución de la expresión de NPY y un aumento de la expresión de POMC en ambos genotipos, lo que podría estar relacionado con la disminución de la ingesta en estos ratones. Esta situación también está descrita como un mecanismo de compensación de la obesidad inducida por la dieta (Bergen et al., 1999; Huang et al., 2003), aunque esta estrategia sólo parece tener éxito en los machos con deficiencia en IL-6 muscular que son resistentes a la obesidad, lo que indicaría la existencia de otros mecanismos que participarían en la regulación de la homeostasis energética y dado que la única diferencia que observamos entre estos machos y los floxados en dieta grasa se halla en la expresión de la ppOx, que sólo aumenta con la dieta grasa en los floxados, ésta podría estar relacionada con el hecho de que los ratones machos floxados desarrollen más obesidad que los *ml-6* KO. En el caso de las hembras la deficiencia de IL-6 muscular amortigua el descenso causado por la dieta grasa en la expresión de NPY, lo

Discusión

que podría explicar que estas hembras ganen más peso que las hembras con una expresión normal de IL-6 muscular en esta situación de alimentación (Lin et al., 2000a).

En principio estos datos indican que los efectos de la deficiencia de la IL-6 en el músculo *versus* el tejido adiposo sobre los factores hipotalámicos no puede explicarse simplemente como causados por el descenso de los niveles sanguíneos de IL-6. Por el contrario, sugieren que la disminución de IL-6 local en estos tejidos alterarían factores intrínsecos que secundariamente serían los responsables de los cambios observados en los factores hipotalámicos. Si son humorales o nerviosos tendrá que ser establecido posteriormente.

La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo (Carbone et al., 2012; Friedman and Halaas, 1998) y cuya principal función es el control de la ingesta y del gasto energético (Schwartz et al., 2000) tanto a nivel del sistema nervioso central, como por mecanismos autocrinos y paracrinos en otros tejidos donde influye en el metabolismo lipídico estimulando la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos (Fruhbeck et al., 1997; Wang et al., 1999) e incrementando el metabolismo de la glucosa (Kamohara et al., 1997). Los niveles de leptina en sangre se correlacionan con el índice de masa corporal tanto en humanos como en roedores (Maffei et al., 1995). Como se esperaba en ambos modelos la leptina aumenta con la dieta grasa (Lin et al., 2000b; Maffei et al., 1995). Nuestros datos muestran que en los ratones deficientes en IL-6 muscular los niveles de leptina en sangre reflejan los cambios en el peso corporal de estos animales. El análisis de la expresión de este gen en el tejido adiposo subcutáneo no se vio afectado por la deficiencia de IL-6 muscular en ninguno de los sexos. En cambio, en los ratones deficientes en IL-6 adipocitaria, a pesar de que no hubo diferencias en los niveles de leptina circulante, estos presentaron una disminución de

la expresión de este gen en el tejido adiposo visceral y en el subcutáneo, que en los machos sólo se dio en el tejido visceral. Por otro lado, está descrito que las neuronas que contienen NPY/AgRP o POMC presentan receptores de leptina (Baskin et al., 1999b; Cheung et al., 1997; Mizuno and Mobbs, 1999) lo que sugiere que el control de la homeostasis energética en el hipotálamo está mediado por esta hormona. La leptina actúa inhibiendo la expresión de NPY y aumentando la expresión de POMC (Elias et al., 1999; Mizuno et al., 1998; Schwartz et al., 1997). Así, en nuestros ratones deficientes en IL-6 muscular, como en sus controles floxados, alimentados con dieta grasa muestran disminuidos los niveles de NPY y aumentados los de POMC respecto a los animales alimentados con dieta control, lo que podría relacionarse con el aumento en la sangre de leptina.

5.5. Homeostasis de la glucosa

Los ratones alimentados con una dieta grasa desarrollan resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa como observamos en general en nuestros experimentos. Los datos publicados en relación al papel de la IL-6 son contradictorios. En el caso del control de la glucemia mientras unos autores han descrito en modelos de ratones con deficiencia total de IL-6 que estos animales desarrollan obesidad con la edad e intolerancia a la glucosa (Wallenius et al., 2002b), otros sólo detectan una respuesta alterada a la glucosa (Di Gregorio et al., 2004). Modelos animales donde hay una inhibición de la señalización de la IL-6 por la delección del receptor de IL-6 en células del parénquima hepático desarrollan también intolerancia a la glucosa (Wunderlich et al., 2010). Por el contrario, estudios en ratones con una expresión mantenida de IL-6, aunque presentan resistencia a la obesidad, desarrollan intolerancia a la glucosa (Hidalgo et al., 2010; Sadagurski et al., 2010). En los machos mIL-6 KO con dieta grasa

Discusión

la deficiencia de IL-6 muscular tendía a mejorar la tolerancia a la glucosa durante la OGTT, mientras que en las hembras esta tendencia se observa con la dieta control.

En el caso del experimento de deficiencia de IL-6 adipocitaria volvemos a confirmar que la dieta grasa inducía intolerancia a la glucosa en ambos sexos. Al igual que en los mL-6 KO no hay grandes diferencias entre los ratones aIL-6 KO y sus controles.

El rol de la IL-6 en la resistencia a la insulina es controvertido y está bajo un intenso debate (Allen and Febbraio, 2010; Carey et al., 2006; Kristiansen and Mandrup-Poulsen, 2005; Mooney, 2007; Pedersen and Febbraio, 2007). Ratones con deficiencia total de IL-6 son resistentes a esta hormona tanto en dieta control como en dieta grasa (Matthews et al., 2010) aunque estos datos no han sido confirmados en otros estudios con ratones con la misma delección, en los que no detectaron una alteración de la respuesta a la insulina en ratones IL-6 KO totales (Di Gregorio et al., 2004). Por otro lado, ratones con delección del receptor de IL-6 en células del parénquima hepático desarrollan resistencia a la insulina (Wunderlich et al., 2010). Contradictoriamente, otros estudios en ratones con un aumento de los niveles sanguíneos de IL-6 también desarrollaron resistencia a la insulina (Sadagurski et al., 2010). En el caso de los ratones deficientes en IL-6 muscular de nuestro estudio, únicamente en los machos se observó una tendencia de la ausencia de IL-6 muscular a mejorar la sensibilidad a la insulina durante la ITT. Por otro lado, estos machos tanto a los 15 minutos del inicio de la OGTT como en condiciones basales presentaron una disminución de la hiperinsulinemia que no se dio en las hembras. Está descrito que la insulina es una hormona que es secretada en proporción al tejido adiposo (Polonsky et al., 1988; Schwartz et al., 2000; Woods and D'Alessio, 2008), por lo que la disminución de la hiperinsulinemia observada podría deberse a la disminución del

peso corporal de estos ratones.

En el caso de los ratones aIL-6 KO no se observó ningún efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria en la respuesta a la insulina. Cuando se analizaron los niveles de insulina en sangre se observó que en las hembras alimentadas con dieta grasa la deficiencia de IL-6 adipocitaria provocó una disminución de la hiperinsulinemia a los 15 minutos del inicio de la OGTT. Aunque sería interesante valorar en alguno de los otros tiempos de la OGTT los niveles de insulina, los datos que tenemos parecen sugerir que la intolerancia a la glucosa en estas hembras se deba a una disminución de la secreción estimulada por la glucosa de la insulina. Para confirmar esto sería útil realizar cultivos de islotes pancreáticos de estos ratones en los que se suplemente el medio a diferentes concentraciones de glucosa y así determinar si hay una alteración de la secreción de la insulina en estas células.

Datos obtenidos en nuestro laboratorio analizando por *western blot* muestras de estos animales tratados con 1 U de insulina muestran que la deficiencia de IL-6 en el músculo esquelético tiene un efecto dependiente del sexo. De esta manera, los machos mIL-6 KO eran más sensibles a la insulina, mientras que las hembras desarrollaron resistencia a la insulina tanto en el hígado como en el músculo esquelético. En el caso de los ratones deficientes en IL-6 proveniente del tejido adiposo, datos preliminares muestran un efecto sexo dependiente de la deficiencia de IL-6 adipocitaria que causaría un incremento de la sensibilidad a la insulina en los machos y lo contrario en las hembras. Los datos que hemos obtenido con los machos, tanto deficientes en IL-6 muscular como adipocitaria, apoyarían que la IL-6 tiene un papel en la resistencia a la insulina. De acuerdo con esto el tratamiento agudo con IL-6 produce resistencia a la insulina tanto en el hígado como en el músculo esquelético (Kim et al., 2004), aunque la administración crónica de IL-6 provoca resistencia a la

Discusión

insulina en el hígado, pero no en el músculo esquelético machos C57BL/6 (Klover et al., 2003). En contraposición a estos datos otro estudio muestra que la administración de IL-6 en ratas promueve la tolerancia a la glucosa, pero no causa resistencia a la insulina (Holmes et al., 2008). Además, en el tejido adiposo los niveles de IL-6 correlacionan con la resistencia a la insulina, así un aumento de IL-6 local produciría resistencia a la captación de glucosa por parte de este tejido (Bastard et al., 2002; Kern et al., 2001). También está descrito que pacientes obesos y pacientes con diabetes tipo 2 presentan un aumento de la IL-6 circulante que estaría relacionado con la resistencia a la insulina que presentan estos pacientes en el tejido adiposo, en el músculo y en el hígado (de Luca and Olefsky, 2008). en cambio, la sobreexpresión de IL-6 humana en el cerebro y pulmón en ratones transgénicos protege a éstos de desarrollar resistencia a la insulina y obesidad en respuesta a dieta grasa (Sadagurski et al., 2010). Otros estudios demuestran que la IL-6 puede favorecer la captación de glucosa en músculo esquelético (Al-Khalili et al., 2006; Carey et al., 2006; Glund et al., 2007). Estudios en ratones con una sobreexpresión de IL-6 en el músculo producida por un proceso de electro-transferencia muestran una disminución de la captación de glucosa en el músculo (Franckhauser et al., 2008). Aún son necesarios más estudios para determinar el papel de la IL-6 en la resistencia a la insulina y la captación de glucosa.

Los genes implicados en la gluconeogénesis, como la glucosa 6 fosfatasa (*G6pc*) y el fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*Pck1*), están regulados tanto por la insulina y el glucagón, como por la IL-6 (Inoue et al., 2006). Hay estudios que muestran que la inyección de IL-6 produce en el hígado una disminución de la expresión del mRNA de *Pck1* en ratas (Lienenluke and Christ, 2007). Además, al tratar con IL-6 cultivos de hepatocitos de rata se observa también la disminución de la expresión de *Pck1* (Christ et al., 2000) y de *G6pc* (Inoue et al., 2004). Datos contradictorios a estos, muestran

que la IL-6 estimula la gluconeogénesis en hepatocitos de rata de manera dependiente de dosis (Blumberg et al., 1995) y regula al alza la expresión del gen *G6pc* a través de la activación de STAT-3 (Leu et al., 2001) y que también es capaz de estimular la producción de glucosa a partir de lactato *in vitro* y de incrementar la expresión del gen *Pck1* en ratones (Fritsche et al., 2010). En nuestros ratones mIL-6 KO, la deficiencia de IL-6 muscular tuvo un efecto dependiente de sexo, así mientras los machos presentaron un aumento de la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis, las hembras mostraron una inhibición de estos. En concordancia con estos resultados, está descrito en ratones machos que la sobreexpresión de IL-6 en músculo esquelético produce una disminución de la expresión del gen *Pck1* (Franckhauser et al., 2008). Los machos deficientes en IL-6 muscular tenían los niveles en sangre de insulina disminuidos lo que es consistente con una mayor activación de los genes implicados en la vía de la gluconeogénesis. A pesar de esto, presentaron una disminución de los niveles circulantes de glucosa, y dado que no se observaron diferencias en la acumulación de glucógeno hepático, esta mayor producción de glucosa debe ser consumida en algún lugar, lo que podría indicar que hay un mayor gasto energético. Este dato respaldaría los datos obtenidos en el estudio de la señalización en el hipotálamo que sugerían que la IL-6 estaba regulando el peso corporal controlando el gasto energético y no tanto por el control de la ingesta. En las hembras la deficiencia de IL-6 muscular produjo una tendencia a aumentar la insulina en la sangre que se correlaciona con una menor expresión de los genes gluconeogénicos. Dado que éstas no presentaron una disminución de la glucosa circulante, como cabría esperar de la disminución de la gluconeogénesis, podría ser debido a que en los tejidos estarían captando menos glucosa y podría estar relacionado con la inhibición del gasto energético que presentaban a nivel del hipotálamo. Para confirmar esto sería necesario analizar la captación de glucosa por parte de tejidos como el músculo esquelético y el tejido adiposo, lo que nos permitiría

Discusión

determinar si los cambios en niveles de glucosa circulante son debidos a una alteración de la captación de ésta por estos tejidos.

Por lo que respecta a los ratones aIL-6 KO, la deficiencia de IL-6 adipocitaria actuó también de manera dependiente del sexo: en los machos, pero no en las hembras, en dieta control tenían inhibidos los genes que codifican para enzimas claves en la gluconeogénesis. En los niveles de insulina de los animales alimentados con dieta control se observó un aumento no significativo que podría estar relacionado con la disminución que se observa en estos genes. Aunque la gluconeogénesis en los machos en dieta control está disminuida no se observan cambios en la glucosa circulante. El hecho de que no se detecte una disminución de los niveles de glucosa en sangre podría ser debido a que hay una menor captación de glucosa por los tejidos, de nuevo se hace necesario plantearse experimentos que nos permitan determinar si la captación de glucosa en tejidos como el adiposo o el músculo esquelético está alterada en estos animales. Además al analizar la expresión de los neuropéptidos hipotalámicos se observa en estos animales un aumento de los péptidos orexigénicos que podrían estar inhibiendo el gasto energético lo que podría explicar que no se vea el descenso en los niveles de glucosa. Las hembras deficientes en IL-6 adipocitaria presentan una disminución de la insulina en sangre pero no se ven cambios en la expresión de genes gluconeogénicos ni en los niveles de glucosa; una posibilidad sería que el hígado sea resistente a la insulina, por lo que se hace necesario plantear más análisis para poder confirmar esta hipótesis.

También se analizó la expresión del gen que codifica para la PGC-1 α que está implicado en diversos procesos biológicos como por ejemplo la biogénesis mitocondrial, el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos, el cambio de tipo de fibra en el músculo esquelético y la termogénesis adaptativa entre otros (Liang and

Ward, 2006). En el hígado el incremento del coactivador transcripcional PGC-1 α induce la expresión de los genes gluconeogénicos (*Pck1* y *G6pc*) (Yoon et al., 2001). En nuestros ratones la deficiencia de IL-6 muscular produjo una disminución en las hembras alimentadas con dieta control de la expresión de este gen, en las que también se observa la disminución de la expresión de genes de la gluconeogénesis. En cambio en los machos, aunque hay un aumento de la expresión de los genes gluconeogénicos no se observó aumento de la expresión del gen *Pparg1a*. En el caso de los ratones deficientes en IL-6 adipocitaria se observó una disminución de la expresión hepática de este gen en las hembras, pero no hubo cambios en la expresión de los genes de la gluconeogénesis y en los machos, donde hubo una disminución de estos genes por efecto de la deficiencia de la IL-6 adipocitaria, no se detectó efecto de esta deficiencia en la expresión de PGC-1 α . Podría ser que el efecto de la deficiencia de IL-6 adipocitaria, así como el de la deficiencia de IL-6 muscular en los machos, en la expresión de los genes de la gluconeogénesis estuviera mediado por algún otro factor.

5.6. Homeostasis de los lípidos

La IL-6 tiene un papel importante en la homeostasis lipídica. Así, esta descrito que estimula la captación de lípidos, incrementa la lipólisis en el hígado y el tejido adiposo y disminuye la síntesis de lípidos en el hígado (Hashizume and Masahiko, 2011). El incremento de la lipólisis inducido por la IL-6 se ha visto tanto en el tejido adiposo *in vivo*, como en cultivos de adipocitos *in vitro* (Petersen et al., 2005; Trujillo et al., 2004). En humanos, la IL-6 tiene un potente efecto en el metabolismo lipídico y se ha demostrado que la administración de IL-6 a pacientes sanos incrementa la oxidación de las grasas y la reesterificación de ácidos grasos (van Hall et al., 2003).

Tanto el tejido adiposo como el muscular captan ácidos grasos circulantes ya sea

Discusión

para almacenarlos en forma de triacilglicerol (tejido adiposo) o bien para obtener energía a partir de su oxidación (músculo). Una enzima importante en este proceso es la lipoproteína lipasa (LPL) que está implicada en la hidrólisis de los triacilgliceroles que forman parte de los quilomicrones (QM) y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), liberando ácidos grasos libres para que puedan ser captados por el tejido adiposo o por el músculo (Braun and Severson, 1992; Mead et al., 2002; Wang and Eckel, 2009; Wong and Schotz, 2002). La IL-6 inhibe la actividad de la LPL en el tejido adiposo *in vivo* e *in vitro* en cultivo de adipocitos (Greenberg et al., 1992; Trujillo et al., 2004). Por el contrario, ratones deficientes en IL-6 que no desarrollan obesidad con la edad no presentan cambios en la actividad LPL (Di Gregorio et al., 2004). En cambio, nuestros datos muestran que en ausencia de IL-6 muscular el gen *Lpl* se ve aumentado en el músculo esquelético, pero únicamente en los machos, en los que no se observaron cambios en la expresión de los genes lipogénicos *Acaca* y *Fasn* ni en el hígado ni en el tejido adiposo. Esto junto al hecho de que estos machos con deficiencia de IL-6 muscular tenían disminuidos los niveles de triglicéridos (TG) circulantes, sugiere que este descenso en los TG podría ser debido a un aumento en la LPL, que estaría mediando la captación de ácidos grasos por parte del músculo esquelético, probablemente para su oxidación, indicando que estos animales tienen un mayor consumo energético, lo que contribuiría a su menor peso. Para verificar esto sería interesante analizar los niveles de proteína LPL por *western blot* en el músculo esquelético, así como valorar la actividad de la LPL en cultivos de miocitos de estos ratones.

En el caso de la deficiencia de IL-6 adipocitaria, ésta produjo un aumento de la expresión de este gen en el tejido adiposo (visceral y subcutáneo) y en el músculo esquelético en dieta grasa, pero en esta ocasión sólo en las hembras, en las que no se observó una disminución significativa de los TG circulantes. Dada la mayor expresión

del gen *Lpl* observada sería interesante estudiar los niveles de proteína, así como la actividad de la enzima para determinar si éstos están alterados a pesar de que la expresión del gen es más elevada.

Aunque se hacen necesarios más estudios para dilucidar el papel de la IL-6 local en el metabolismo de los lípidos, nuestros datos sugieren que sí que juega un papel y que probablemente esté más relacionado con la captación en los tejidos que con la síntesis *de novo*.

5.7. Inflamación

Una de las características de la obesidad es que se desarrolla un estado crónico de inflamación leve (Eder et al., 2009; Hotamisligil, 2006; Shoelson et al., 2007; Wellen and Hotamisligil, 2005) en el que se da un aumento de citoquinas proinflamatorias, como el TNF α , la IL-1 β y la IL-6 (Kern et al., 2001; Trayhurn and Wood, 2004) y de infiltración de macrófagos en el tejido adiposo (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003).

En nuestro modelo de deficiencia de IL-6 muscular no vimos aumento con la dieta grasa ni en la expresión de IL-6 ni en la de IL-1 β ni en el tejido adiposo ni en el hígado, pero sí que se dio un aumento de la expresión de los genes *Emr1* (codifica para el marcador F4/80 de macrófagos, (Gordon et al., 2011)) y *Ccl2* (que codifica para una quimioquina atrayente de macrófagos, la MCP-1 (Kanda et al., 2006)), lo que indicaría que probablemente hay un aumento de macrófagos infiltrados en el tejido que podrían ser, en parte, responsables de desarrollar el estado inflamatorio que está descrito que se da en los animales obesos. Para confirmar esto sería conveniente realizar una inmunohistoquímica con anticuerpos anti F4/80 para detectar si realmente hay infiltrado de macrófagos.

Discusión

Por otro lado en este modelo de deficiencia de IL-6 muscular, los ratones tratados con insulina presentaron un aumento de las citoquinas IL-1 β y IL-6 en el hígado tal y como esta descrito en la bibliografía (Wunderlich et al., 2010).

En el caso de los ratones aIL-6KO se vio un aumento con la dieta grasa de la expresión del gen que codifican para el TNF α , una de las principales citoquinas relacionadas con la inflamación asociada a obesidad y con un papel en la resistencia a la insulina (Fasshauer and Paschke, 2003; Hotamisligil, 1999; Shoelson et al., 2006; Wellen and Hotamisligil, 2005). Este estado de inflamación era revertido por la deficiencia de IL-6 adipocitaria. En este modelo con la dieta grasa la expresión de los genes *Emr1* y *Ccl2* indicaba que podría haber un aumento de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo visceral y en el subcutáneo. Los machos deficientes en IL-6 adipocitaria tenían también disminuidos estos genes cuando eran alimentados con una dieta grasa. Estos datos sugerían que la deficiencia de IL-6 adipocitaria en machos, a pesar de que no se observaron diferencias en el peso de estos animales, palió los efectos inflamatorios de la obesidad. Estos datos indican que los macrófagos juegan un importante papel en la inflamación y que es probable que estén implicados en los cambios observados en las citoquinas. De esta forma, los ratones deficientes en IL-6 adipocitaria no desarrollarían (o desarrollarían en menor grado) el estado de inflamación derivado de la acumulación de lípidos en el tejido adiposo, lo que contribuiría a tener más sensibilidad a la insulina.

5.8. Termogénesis

En el control del balance energético es fundamental una respuesta adecuada, por lo que la coordinación entre el almacenamiento y el consumo de los lípidos es crucial. La IL-6 no sólo juega un papel en el control del peso corporal, sino que además

aumenta la termogénesis en el tejido adiposo marrón (BAT) (Cannon et al., 1998; Li et al., 2002; Schobitz et al., 1995). Varios estudios muestran que la IL-6 puede estimular la temperatura corporal (Chai et al., 1996; Kozak et al., 1998; Leon et al., 1998) de esta manera, tanto el tratamiento agudo (Cannon et al., 1998) como el crónico (Li et al., 2002) con IL-6 producen una activación de la termogénesis en el BAT. También está descrito que ratones deficientes en IL-6 endógena (IL-6 KO totales) presentan disminuida la termogénesis, así como el gasto energético (Wernsedt et al., 2006). En el caso de nuestros modelos animales, sólo se estudió la respuesta al frío en los ratones deficientes en IL-6 muscular. Los ratones mL-6 KO presentan una peor respuesta a la exposición al frío (4°C) que en el caso de las hembras aún está más exacerbada, llegando a causar mortalidad. Esto podría indicar una menor activación de la termogénesis. Además, el peor control en las hembras podría estar relacionado con la inhibición del gasto energético que presentan, mientras que el fenotipo más benigno que presentan los machos podría estar relacionado con la expresión de neuropéptidos hipotalámicos que causan un aumento del gasto energético.

Por otro lado la posible menor activación de la termogénesis podría relacionarse con el hecho de que presentan una disminución del mRNA de CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo, que está descrito que tiene un papel en la termogénesis (Richard et al., 2002). Está descrito que la administración central sostenida de IL-6 estimula la termogénesis vía la proteína UCP-1 (Li et al, 2002). Así, en nuestros animales, para tener más información sería interesante estudiar los niveles de UCP1 tanto su expresión génica como los niveles de proteínas.

Discusión

5.9. Dimorfismo sexual

Tanto la deficiencia de IL-6 muscular como la adipocitaria se comportaron de manera dependiente del sexo. Los motivos de estas diferencias están aún por determinar. Hay estudios que apoyan el hecho de que hembras y machos responden de manera diferente a dietas altas en calorías provenientes de la grasa. Estas diferencias podrían ser originadas por el estatus esteroideo gonadal (Barros et al., 2006; Yakar et al., 2006) y serían debidas a la interacción entre los estrógenos y las vías metabólicas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y de los lípidos (Yakar et al., 2006). Hay estudios que muestran que las hormonas ováricas tendrían un papel protector contra el síndrome metabólico, así antes de la menopausia la prevalencia a desarrollar alteraciones metabólicas es más alto en machos que en las hembras, pero después de la menopausia son las hembras las que tienen una mayor probabilidad de desarrollar desordenes metabólicos (Shi et al., 2009). Para poder confirmar la implicación de las hormonas sexuales sería necesario plantearse experimentos en los que se incluyesen ratones gonadectomizados.

A nivel del sistema nervioso central en el control de la homeostasis energética también se han descrito diferencias entre sexos. Estas diferencias serían debidas a la sensibilidad a las señales adipocitarias, principalmente la insulina y leptina, que interaccionarían con el sistema de control de la ingesta en el cerebro. De esta manera los niveles de leptina en sangre correlacionarían con el tejido adiposo subcutáneo (Clegg et al., 2003) y los de insulina serían proporcionales a los acúmulos de grasa visceral (Shi et al., 2009; Woods et al., 2003). Las hembras tienen una mayor tendencia a acumular la grasa en el tejido adiposo subcutáneo por lo que presentan mayores niveles de leptina, mientras que los machos tienden a acumularlas en el tejido visceral lo que se relaciona con mayores niveles de insulina en sangre

Discusión

(Lonnqvist et al., 1997; Wajchenberg, 2000). De esta manera, el cerebro de las hembras es más sensible a la acción catabólica de pequeñas dosis de leptina y el de los machos lo es a la acción catabólica a pequeñas dosis de insulina (Woods et al., 2003). En nuestros modelos, tanto en la deficiencia de IL-6 muscular como adipocitaria, aunque no detectamos diferencias en el tamaño de los depósitos de grasa entre machos y hembras, sí que vemos una tendencia en las hembras a tener mayores niveles de leptina en sangre que los machos, y en el caso de los machos los niveles de insulina en sangre tienden a ser mayores que los de las hembras.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

Con respecto a los ratones mL-6 KO

1. Se han obtenido ratones *knock-out* condicionales con la delección de la citoquina IL-6 en el músculo esquelético. Estos ratones no presentaron alteraciones del crecimiento, aunque cuando eran alimentados con una dieta control (dieta estándar) los machos presentaron resistencia a ganar peso, mientras que las hembras tendían a engordar más, lo que sugiere un rol de la IL-6 muscular en la ganancia de peso dependiente del sexo.
2. La deficiencia de IL-6 muscular no afectó a las capacidades sensorimotoras de estos animales en elementos estáticos, pero sí en el test de *rotarod* en el que mejoró el resultado disminuyendo el número de caídas.
3. Los animales deficientes en IL-6 muscular presentaron un peor control de la temperatura al ser mantenidos a 4 °C, especialmente las hembras en las que incluso se dio mortalidad. Esto sugiere que la IL-6 tiene un papel importante en la regulación de la temperatura. En el caso de las hembras esto indicaría que presentan una menor activación de la termogénesis y podría relacionarse con la tendencia a ganar más peso.
4. Los animales alimentados con la dieta grasa desarrollaron obesidad que exacerbó las diferencias observadas entre genotipos en animales alimentados con la dieta estándar.
5. Las características de los depósitos de grasa eran un reflejo del peso corporal de estos animales.: aumentaron con la dieta grasa en ambos sexos y mientras los

Conclusiones

machos deficientes en IL-6 muscular eran resistentes a la obesidad y tenían menos cantidad de grasa, las hembras eran sensibles a la obesidad y tenían mayores depósitos de grasa. Además, los cambios en estos depósitos vendrían dados por cambios en el tamaño de los adipocitos, que acumularían más lípidos, y no por un aumento en el número de células.

6. Los animales alimentados con dieta grasa desarrollaron esteatosis hepática. La deficiencia de IL-6 muscular actuó de manera dependiente del sexo, disminuyendo el acúmulo de grasas en el hígado únicamente en los machos.
7. Las diferencias de peso causadas por la deficiencia de IL-6 muscular no pueden ser explicadas por cambios en la ingesta. Cuando se realizó el test de *hole board*, se observó que estos ratones alimentados con dieta control, presentaban un aumento de la actividad en el caso de los machos, y un descenso en el caso de las hembras, que podrían explicar los cambios en el peso de estos ratones. Esta idea estaría reforzada por la expresión de neuropéptidos hipotalámicos implicados en el gasto energético.
8. La deficiencia de IL-6 muscular tendió a revertir la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta grasa, pero únicamente en los machos. Esto indicaría que la IL-6 tiene un efecto sexo dependiente en el metabolismo.
9. Con la obesidad inducida por dieta grasa aumentó la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo pero no se dio aumento de la expresión de los genes que codifican para citoquinas inflamatorias. La deficiencia de IL-6 muscular no afectó al estado inflamatorio relacionado con la obesidad de estos animales.

Con respecto a los ratones aIL-6 KO

10. También se han obtenido ratones *knock-out* condicionales con delección de la citoquina IL-6 en el tejido adiposo. La eficiencia de la delección es más efectiva en machos que en hembras. Además la delección de IL-6 en el tejido adiposo parece ser que se da tanto en adipocitos como en macrófagos. Estos animales no presentaron alteraciones ni en el crecimiento ni en la ganancia de peso cuando fueron alimentados con una dieta estándar.
11. Los ratones alimentados con la dieta grasa desarrollaron obesidad. En estos animales afloraron diferencias sexo dependientes en la ganancia de peso que no se dieron en en los animales alimentados con la dieta estándar. De esta manera la deficiencia de IL-6 adipocitaria produjo resistencia a la obesidad en las hembras, mientras que este efecto en los machos fue mucho más leve.
12. En los ratones deficientes en IL-6 adipocitaria las diferencias en los depósitos de grasa no reflejaron del todo los cambios en el peso corporal, por lo que seguramente debe haber cambios en otros tejidos. Por otro lado, los diferentes depósitos de grasa que se han analizado no se comportan igual con respecto al número y tamaño de los adipocitos. La IL-6 parece jugar un papel en la proliferación y/o diferenciación de estas células.
13. Los ratones deficientes en IL-6 adipocitaria alimentados con dieta grasa desarrollaron esteatosis hepática. En el caso de las hembras esta deficiencia tendió a revertirla.
14. En el caso de los ratones deficientes en IL-6 adipocitaria la ingesta por si sola no acabó de explicar los cambios en la ganancia que se observaron en estos animales.

Conclusiones

El análisis de los neuropéptidos hipotalámicos implicados en el control de la homeostasis energética de los ratones alimentados con una dieta estándar, aunque no se observaron diferencias en la ganancia de peso, mostraron un efecto sexo dependiente en el que los machos tendían a disminuir su gasto energético y las hembras a aumentarlo.

15. Los ratones alimentados con dieta grasa desarrollaron resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. La deficiencia de IL-6 adipocitaria tendió a empeorar estas respuestas en las hembras.

16. Con la obesidad inducida por dieta grasa aumentó la expresión de genes relacionados con la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, que se vio disminuida por la deficiencia de IL-6 adipocitaria en el tejido visceral de los machos. En esta ocasión se observó el aumento de la expresión génica de algunas citoquinas proinflamatorias en los animales alimentados con dieta grasa. La deficiencia de IL-6 adipocitaria tendió a revertir la expresión de algunos de los genes implicados en la inflamación analizados en los machos en el tejido adiposo visceral. También se observó que los diferentes depósitos de grasa estudiados no se comportaban igual. Los datos mostraron que los macrófagos serían los principales responsables de estos cambios.

En resumen,

18. La IL-6 tiene efectos en el control de la homeostasis energética a nivel central y periférico. Nuestros datos muestran que la IL-6 producida por tejidos periféricos como el músculo esquelético o el tejido adiposo, tiene un papel local controlando el metabolismo. La disminución de los niveles plasmáticos de IL-6 tiene diferentes efectos en la expresión de los neuropéptidos hipotalámicos implicados en el control

Conclusiones

de la ingesta y el gasto energético según su origen (músculo esquelético o tejido adiposo), esto junto al hecho de que muy poca cantidad de IL-6 consigue atravesar la BHE descrito en la bibliografía, sugiere que esta citoquina regula a nivel local la expresión de otro u otros factores que probablemente sea o sean los responsables de los efectos observados en el hipotálamo.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11, 36-44.
- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M.F., 2000. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *The Journal of biological chemistry* 275, 9047-9054.
- Air, E.L., Benoit, S.C., Blake Smith, K.A., Clegg, D.J., Woods, S.C., 2002. Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 72, 423-429.
- Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M., Berns, A., 1997. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic acids research* 25, 1766-1773.
- Al-Khalili, L., Bouzakri, K., Glund, S., Lonnqvist, F., Koistinen, H.A., Krook, A., 2006. Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 20, 3364-3375.
- Ali, C., Nicole, O., Docagne, F., Lesne, S., MacKenzie, E.T., Nouvelot, A., Buisson, A., Vivien, D., 2000. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20, 956-966.
- Aloisi, F., Care, A., Borsellino, G., Gallo, P., Rosa, S., Bassani, A., Cabibbo, A., Testa, U., Levi, G., Peschle, C., 1992. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149, 2358-2366.
- Allen, T.L., Febbraio, M.A., 2010. IL6 as a mediator of insulin resistance: fat or fiction? *Diabetologia* 53, 399-402.
- Aponte, Y., Atasoy, D., Sternson, S.M., 2011. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience* 14, 351-355.
- Armario, A., Hernandez, J., Bluethmann, H., Hidalgo, J., 1998. IL-6 deficiency leads to increased emotionality in mice: evidence in transgenic mice carrying a null mutation for IL-6. *Journal of neuroimmunology* 92, 160-169.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., Chazaud, B., 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine* 204, 1057-1069.
- Assier, E., Boissier, M.C., Dayer, J.M., 2010. Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 77, 532-536.
- Bagdade, J.D., Bierman, E.L., Porte, D., Jr., 1967. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *The Journal of clinical*

Bibliografia

- investigation 46, 1549-1557.
- Balasingam, V., Tejada-Berges, T., Wright, E., Bouckova, R., Yong, V.W., 1994. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14, 846-856.
- Balschun, D., Wetzell, W., Del Rey, A., Pitossi, F., Schneider, H., Zuschratter, W., Besedovsky, H.O., 2004. Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1788-1790.
- Baltgalvis, K.A., Berger, F.G., Pena, M.M., Davis, J.M., Muga, S.J., Carson, J.A., 2008. Interleukin-6 and cachexia in *ApcMin/+* mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 294, R393-401.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Gutierrez, E.G., 1994. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neuroscience letters* 179, 53-56.
- Barbuio, R., Milanski, M., Bertolo, M.B., Saad, M.J., Velloso, L.A., 2007. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *The Journal of endocrinology* 194, 539-550.
- Barnum, S.R., Jones, J.L., Muller-Ladner, U., Samimi, A., Campbell, I.L., 1996. Chronic complement C3 gene expression in the CNS of transgenic mice with astrocyte-targeted interleukin-6 expression. *Glia* 18, 107-117.
- Barros, R.P., Machado, U.F., Gustafsson, J.A., 2006. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends in molecular medicine* 12, 425-431.
- Baskin, D.G., Breininger, J.F., Schwartz, M.W., 1999a. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48, 828-833.
- Baskin, D.G., Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Breininger, J.F., Jonak, Z., Schaefer, J., Krouse, M., Burghardt, C., Campfield, L.A., Burn, P., Kochan, J.P., 1999b. Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 47, 353-362.
- Bastard, J.P., 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 3338-3342.
- Bastard, J.P., Maachi, M., Van Nhieu, J.T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J.J., Capeau, J., Hainque, B., 2002. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 2084-2089.
- Bataille, R., Jourdan, M., Zhang, X.G., Klein, B., 1989. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *The Journal of clinical investigation* 84, 2008-2011.
- Bauer, S., Kerr, B.J., Patterson, P.H., 2007. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nature reviews. Neuroscience* 8, 221-232.

- Baura, G.D., Foster, D.M., Porte, D., Jr, Kahn, S.E., Bergman, R.N., Cobelli, C., Schwartz, M.W., 1993. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *The Journal of clinical investigation* 92, 1824-1830.
- Benoit, S.C., Thiele, T.E., Heinrichs, S.C., Rushing, P.A., Blake, K.A., Steeley, R.J., 2000. Comparison of central administration of corticotropin-releasing hormone and urocortin on food intake, conditioned taste aversion, and c-Fos expression. *Peptides* 21, 345-351.
- Benrick, A., Schele, E., Pinnock, S.B., Wernstedt-Asterholm, I., Dickson, S.L., Karlsson-Lindahl, L., Jansson, J.O., 2009. Interleukin-6 gene knockout influences energy balance regulating peptides in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Journal of neuroendocrinology* 21, 620-628.
- Bergen, H.T., Mizuno, T., Taylor, J., Mobbs, C.V., 1999. Resistance to diet-induced obesity is associated with increased proopiomelanocortin mRNA and decreased neuropeptide Y mRNA in the hypothalamus. *Brain research* 851, 198-203.
- Berner, H.S., Lyngstadaas, S.P., Spahr, A., Monjo, M., Thommesen, L., Drevon, C.A., Syversen, U., Reseland, J.E., 2004. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 35, 842-849.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Bird, S., Zou, J., Savan, R., Kono, T., Sakai, M., Woo, J., Secombes, C., 2005. Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. *Developmental and comparative immunology* 29, 775-789.
- Bjursell, M., Gerdin, A.K., Ploj, K., Svensson, D., Svensson, L., Oscarsson, J., Snaith, M., Tornell, J., Bohlooly, Y.M., 2006. Melanin-concentrating hormone receptor 1 deficiency increases insulin sensitivity in obese leptin-deficient mice without affecting body weight. *Diabetes* 55, 725-733.
- Blindenbacher, A., Wang, X., Langer, I., Savino, R., Terracciano, L., Heim, M.H., 2003. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 38, 674-682.
- Blumberg, D., Hochwald, S., Brennan, M.F., Burt, M., 1995. Interleukin-6 stimulates gluconeogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism: clinical and experimental* 44, 145-146.
- Bolin, L.M., Zhaung, A., Strychkarska-Orczyk, I., Nelson, E., Huang, I., Malit, M., Nguyen, Q., 2005. Differential inflammatory activation of IL-6 (-/-) astrocytes. *Cytokine* 30, 47-55.
- Boni-Schnetzler, M., Boller, S., Debray, S., Bouzakri, K., Meier, D.T., Prazak, R., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Ehes, J.A., Schuit, F.C., Donath, M.Y., 2009. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology* 150, 5218-5229.
- Booth, F.W., Chakravarthy, M.V., Gordon, S.E., Spangenburg, E.E., 2002. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. *J Appl Physiol* 93, 3-30.
- Bothe, G.W., Haspel, J.A., Smith, C.L., Wiener, H.H., Burden, S.J., 2000. Selective expression of Cre recombinase in skeletal muscle fibers. *Genesis* 26, 165-166.
- Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigne, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I.,

Bibliografia

- Knibiehler, B., Carpenne, C., Audigier, Y., Saulnier-Blache, J.S., Valet, P., 2005. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146, 1764-1771.
- Boulanger, M.J., Chow, D.C., Brevnova, E.E., Garcia, K.C., 2003. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300, 2101-2104.
- Brakenhielm, E., Cao, R., Gao, B., Angelin, B., Cannon, B., Parini, P., Cao, Y., 2004. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circulation research* 94, 1579-1588.
- Braun, J.E., Severson, D.L., 1992. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *The Biochemical journal* 287 (Pt 2), 337-347.
- Bruce, C.R., Dyck, D.J., 2004. Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 287, E616-621.
- Bruunsgaard, H., Galbo, H., Halkjaer-Kristensen, J., Johansen, T.L., MacLean, D.A., Pedersen, B.K., 1997. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *The Journal of physiology* 499 (Pt 3), 833-841.
- Buettner, R., Parhofer, K.G., Woenckhaus, M., Wrede, C.E., Kunz-Schughart, L.A., Scholmerich, J., Bollheimer, L.C., 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of molecular endocrinology* 36, 485-501.
- Butterweck, V., Prinz, S., Schwaninger, M., 2003. The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice. *Behavioural brain research* 144, 49-56.
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P.A., Hansen, L., Lee, J., Shoelson, S.E., 2005. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature medicine* 11, 183-190.
- Campbell, I.L., Abraham, C.R., Masliah, E., Kemper, P., Inglis, J.D., Oldstone, M.B., Mucke, L., 1993. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10061-10065.
- Campbell, I.L., Hobbs, M.V., Dockter, J., Oldstone, M.B., Allison, J., 1994. Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *The American journal of pathology* 145, 157-166.
- Campbell, I.L., Kay, T.W., Oxbrow, L., Harrison, L.C., 1991. Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. *The Journal of clinical investigation* 87, 739-742.
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., Burn, P., 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546-549.
- Cannella, B., Raine, C.S., 2004. Multiple sclerosis: cytokine receptors on oligodendrocytes predict innate regulation. *Annals of neurology* 55, 46-57.
- Cannon, B., Houstek, J., Nedergaard, J., 1998. Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis? *Annals of the New York Academy of Sciences* 856, 171-187.

- Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* 84, 277-359.
- Cao, Z., Gao, Y., Bryson, J.B., Hou, J., Chaudhry, N., Siddiq, M., Martinez, J., Spencer, T., Carmel, J., Hart, R.B., Filbin, M.T., 2006. The cytokine interleukin-6 is sufficient but not necessary to mimic the peripheral conditioning lesion effect on axonal growth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 5565-5573.
- Carbone, F., La Rocca, C., Matarese, G., 2012. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* 94, 2082-2088.
- Carey, A.L., Bruce, C.R., Sacchetti, M., Anderson, M.J., Olsen, D.B., Saltin, B., Hawley, J.A., Febbraio, M.A., 2004. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. *Diabetologia* 47, 1029-1037.
- Carey, A.L., Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Thomas, W.G., Holmes, A.G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M.J., James, D.E., Kemp, B.E., Pedersen, B.K., Febbraio, M.A., 2006. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 55, 2688-2697.
- Cinti, S., 2009. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 297, E977-986.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., Obin, M.S., 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research* 46, 2347-2355.
- Clegg, D.J., Riedy, C.A., Smith, K.A., Benoit, S.C., Woods, S.C., 2003. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* 52, 682-687.
- Coenen, K.R., Gruen, M.L., Chait, A., Hasty, A.H., 2007. Diet-induced increases in adiposity, but not plasma lipids, promote macrophage infiltration into white adipose tissue. *Diabetes* 56, 564-573.
- Collins, C.A., Olsen, I., Zammit, P.S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T.A., Morgan, J.E., 2005. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122, 289-301.
- Cone, R.D., Cowley, M.A., Butler, A.A., Fan, W., Marks, D.L., Low, M.J., 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 Suppl 5, S63-67.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., et al., 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine* 334, 292-295.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., Low, M.J., 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480-484.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier,

Bibliografia

- M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., Horvath, T.L., 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649-661.
- Crawley, J.N., 1999. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain research* 835, 18-26.
- Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V., Taub, R., 1996. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274, 1379-1383.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., Weigle, D.S., 2001. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714-1719.
- Curiel, R.E., Lahesmaa, R., Subleski, J., Cippitelli, M., Kirken, R.A., Young, H.A., Ghosh, P., 1997. Identification of a Stat-6-responsive element in the promoter of the human interleukin-4 gene. *European journal of immunology* 27, 1982-1987.
- Chai, Z., Gatti, S., Toniatti, C., Poli, V., Bartfai, T., 1996. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 183, 311-316.
- Chalaris, A., Gewiese, J., Paliga, K., Fleig, L., Schneede, A., Krieger, K., Rose-John, S., Scheller, J., 2010. ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase. *Biochimica et biophysica acta* 1803, 234-245.
- Charge, S.B., Rudnicki, M.A., 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews* 84, 209-238.
- Cheung, C.C., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1997. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138, 4489-4492.
- Choi, S.E., Choi, K.M., Yoon, I.H., Shin, J.Y., Kim, J.S., Park, W.Y., Han, D.J., Kim, S.C., Ahn, C., Kim, J.Y., Hwang, E.S., Cha, C.Y., Szot, G.L., Yoon, K.H., Park, C.G., 2004. IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transplant immunology* 13, 43-53.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-534, 536-537.
- Christ, B., Yazici, E., Nath, A., 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C contribute to the inhibition by interleukin 6 of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 31, 461-468.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K., 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M., 2000. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141,

4255-4261.

- De Benedetti, F., Alonzi, T., Moretta, A., Lazzaro, D., Costa, P., Poli, V., Martini, A., Ciliberto, G., Fattori, E., 1997. Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *The Journal of clinical investigation* 99, 643-650.
- de Luca, C., Olefsky, J.M., 2008. Inflammation and insulin resistance. *FEBS letters* 582, 97-105.
- De Rossi, M., Bernasconi, P., Baggi, F., de Waal Malefyt, R., Mantegazza, R., 2000. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *International immunology* 12, 1329-1335.
- Delaigle, A.M., Jonas, J.C., Bauche, I.B., Cornu, O., Brichard, S.M., 2004. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 145, 5589-5597.
- Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Duhault, J., Nahon, J.L., Levens, N., 2002. Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 26, 1289-1295.
- Diehl, S.A., Schmidlin, H., Nagasawa, M., Blom, B., Spits, H., 2012. IL-6 triggers IL-21 production by human CD4+ T cells to drive STAT3-dependent plasma cell differentiation in B cells. *Immunology and cell biology* 90, 802-811.
- Dienz, O., Eaton, S.M., Bond, J.P., Neveu, W., Moquin, D., Noubade, R., Briso, E.M., Charland, C., Leonard, W.J., Ciliberto, G., Teuscher, C., Haynes, L., Rincon, M., 2009. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 206, 69-78.
- Di Gregorio, G.B., Hensley, L., Lu, T., Ranganathan, G., Kern, P.A., 2004. Lipid and carbohydrate metabolism in mice with a targeted mutation in the IL-6 gene: absence of development of age-related obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 287, E182-187.
- Di Santo, E., Alonzi, T., Fattori, E., Poli, V., Ciliberto, G., Sironi, M., Gnocchi, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Ghezzi, P., 1996. Overexpression of interleukin-6 in the central nervous system of transgenic mice increases central but not systemic proinflammatory cytokine production. *Brain research* 740, 239-244.
- Di Santo, E., Alonzi, T., Poli, V., Fattori, E., Toniatti, C., Sironi, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Ghezzi, P., 1997. Differential effects of IL-6 on systemic and central production of TNF: a study with IL-6-deficient mice. *Cytokine* 9, 300-306.
- DiGirolamo, M., Newby, F.D., Lovejoy, J., 1992. Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6, 2405-2412.
- Donath, M.Y., Boni-Schnetzler, M., Ellingsgaard, H., Halban, P.A., Ehses, J.A., 2010. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21, 261-267.

Bibliografía

- Durante, P.E., Mustard, K.J., Park, S.H., Winder, W.W., Hardie, D.G., 2002. Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscles. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283, E178-186.
- Eder, K., Baffy, N., Falus, A., Fulop, A.K., 2009. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 58, 727-736.
- Ehnes, J.A., Lacraz, G., Giroix, M.H., Schmidlin, F., Coulaud, J., Kassis, N., Irminger, J.C., Kergoat, M., Portha, B., Homo-Delarche, F., Donath, M.Y., 2009. IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13998-14003.
- Ehnes, J.A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J.A., Maor-Cahn, R., Gueripel, X., Ellingsgaard, H., Schneider, M.K., Biollaz, G., Fontana, A., Reinecke, M., Homo-Delarche, F., Donath, M.Y., 2007. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 2356-2370.
- Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Flier, J.S., Saper, C.B., Elmquist, J.K., 1999. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23, 775-786.
- Ellingsgaard, H., Ehnes, J.A., Hammar, E.B., Van Lommel, L., Quintens, R., Martens, G., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Berney, T., Pipeleers, D., Halban, P.A., Schuit, F.C., Donath, M.Y., 2008. Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13163-13168.
- Enevoldsen, L.H., Stallknecht, B., Fluckey, J.D., Galbo, H., 2000. Effect of exercise training on in vivo lipolysis in intra-abdominal adipose tissue in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 279, E585-592.
- Erta, M., Quintana, A., Hidalgo, J., 2012. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International journal of biological sciences* 8, 1254-1266.
- Eulenfeld, R., Dittrich, A., Khouri, C., Muller, P.J., Mutze, B., Wolf, A., Schaper, F., 2012. Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *European journal of cell biology* 91, 486-495.
- Fagerlund, R., Melen, K., Kinnunen, L., Julkunen, I., 2002. Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *The Journal of biological chemistry* 277, 30072-30078.
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., Bahouth, S.W., 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-2282.
- Fajas, L., 2003. Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Annals of medicine* 35, 79-85.
- Farley, F.W., Soriano, P., Steffen, L.S., Dymecki, S.M., 2000. Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis* 28, 106-110.
- Fasshauer, M., Paschke, R., 2003. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 46, 1594-1603.

- Fattori, E., Cappelletti, M., Costa, P., Sellitto, C., Cantoni, L., Carelli, M., Faggioni, R., Fantuzzi, G., Ghezzi, P., Poli, V., 1994. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 180, 1243-1250.
- Febbraio, M.A., Hiscock, N., Sacchetti, M., Fischer, C.P., Pedersen, B.K., 2004. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes* 53, 1643-1648.
- Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., 2002. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 1335-1347.
- Febbraio, M.A., Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R.L., Nielsen, H.B., Krstrup, P., Ott, P., Secher, N.H., Pedersen, B.K., 2003. Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *The Journal of physiology* 549, 607-612.
- Fischer, C.P., 2006. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise immunology review* 12, 6-33.
- Fischer, C.P., Berntsen, A., Perstrup, L.B., Eskildsen, P., Pedersen, B.K., 2007. Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 17, 580-587.
- Fischer, C.P., Hiscock, N.J., Penkowa, M., Basu, S., Vessby, B., Kallner, A., Sjoberg, L.B., Pedersen, B.K., 2004a. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *The Journal of physiology* 558, 633-645.
- Fischer, C.P., Plomgaard, P., Hansen, A.K., Pilegaard, H., Saltin, B., Pedersen, B.K., 2004b. Endurance training reduces the contraction-induced interleukin-6 mRNA expression in human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 287, E1189-1194.
- Fonseca-Alaniz, M.H., Takada, J., Alonso-Vale, M.I., Lima, F.B., 2007. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *Jornal de pediatria* 83, S192-203.
- Fontana, L., Eagon, J.C., Trujillo, M.E., Scherer, P.E., Klein, S., 2007. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56, 1010-1013.
- Franckhauser, S., Elias, I., Rotter Sopasakis, V., Ferre, T., Nagaev, I., Andersson, C.X., Agudo, J., Ruberte, J., Bosch, F., Smith, U., 2008. Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia* 51, 1306-1316.
- Fried, S.K., Leibel, R.L., Edens, N.K., Kral, J.G., 1993. Lipolysis in intraabdominal adipose tissues of obese women and men. *Obesity research* 1, 443-448.
- Friedman, J.M., Halaas, J.L., 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.
- Fritsche, L., Hoene, M., Lehmann, R., Ellingsgaard, H., Hennige, A.M., Pohl, A.K., Haring, H.U., Schleicher, E.D., Weigert, C., 2010. IL-6 deficiency in mice neither impairs induction of metabolic genes in the liver nor affects blood glucose levels during fasting and moderately intense exercise. *Diabetologia* 53, 1732-1742.
- Fruhbeck, G., Aguado, M., Martinez, J.A., 1997. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes:

Bibliografia

- evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochemical and biophysical research communications* 240, 590-594.
- Fu, X.Y., Schindler, C., Improta, T., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr., 1992. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7840-7843.
- Fujimoto, S.T., Longhi, L., Saatman, K.E., Conte, V., Stocchetti, N., McIntosh, T.K., 2004. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28, 365-378.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation* 114, 1752-1761.
- Gadient, R.A., Otten, U., 1996. Postnatal expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat sympathetic and sensory ganglia. *Brain research* 724, 41-46.
- Galiano, M., Liu, Z.Q., Kalla, R., Bohatschek, M., Koppius, A., Gschwendtner, A., Xu, S., Werner, A., Kloss, C.U., Jones, L.L., Bluethmann, H., Raivich, G., 2001. Interleukin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *The European journal of neuroscience* 14, 327-341.
- Galic, S., Oakhill, J.S., Steinberg, G.R., 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology* 316, 129-139.
- Gao, Y., Ng, Y.K., Lin, J.Y., Ling, E.A., 2000. Expression of immunoregulatory cytokines in neurons of the lateral hypothalamic area and amygdaloid nuclear complex of rats immunized against human IgG. *Brain research* 859, 364-368.
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., Baumann, H., 1987. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7251-7255.
- Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P.C., Graeve, L., 1996. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *The Journal of biological chemistry* 271, 12991-12998.
- Gesta, S., Bluher, M., Yamamoto, Y., Norris, A.W., Berndt, J., Kralisch, S., Boucher, J., Lewis, C., Kahn, C.R., 2006. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6676-6681.
- Ghosh, K., Van Duyne, G.D., 2002. Cre-loxP biochemistry. *Methods* 28, 374-383.
- Giese, B., Roderburg, C., Sommerauer, M., Wortmann, S.B., Metz, S., Heinrich, P.C., Muller-Newen, G., 2005. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *Journal of cell science* 118, 5129-5140.

- Girotti, M., Donegan, J.J., Morilak, D.A., 2012. Influence of hypothalamic IL-6/gp130 receptor signaling on the HPA axis response to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*.
- Glund, S., Deshmukh, A., Long, Y.C., Moller, T., Koistinen, H.A., Caidahl, K., Zierath, J.R., Krook, A., 2007. Interleukin-6 directly increases glucose metabolism in resting human skeletal muscle. *Diabetes* 56, 1630-1637.
- Gordon, S., Hamann, J., Lin, H.H., Stacey, M., 2011. F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *European journal of immunology* 41, 2472-2476.
- Gorlich, D., Mattaj, I.W., 1996. Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271, 1513-1518.
- Gottschling-Zeller, H., Birgel, M., Scriba, D., Blum, W.F., Hauner, H., 1999. Depot-specific release of leptin from subcutaneous and omental adipocytes in suspension culture: effect of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 141, 436-442.
- Greenberg, A.S., Nordan, R.P., McIntosh, J., Calvo, J.C., Scow, R.O., Jablons, D., 1992. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer research* 52, 4113-4116.
- Guillemin, G., Boussin, F.D., Le Grand, R., Croitoru, J., Coffigny, H., Dormont, D., 1996. Granulocyte macrophage colony stimulating factor stimulates in vitro proliferation of astrocytes derived from simian mature brains. *Glia* 16, 71-80.
- Gurniak, C.B., Berg, L.J., 1996. Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood* 87, 3151-3160.
- Hack, C.E., De Groot, E.R., Felt-Bersma, R.J., Nuijens, J.H., Strack Van Schijndel, R.J., Eerenberg-Belmer, A.J., Thijs, L.G., Aarden, L.A., 1989. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 74, 1704-1710.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M., 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543-546.
- Hardin, J.W., Hilbe, J.M. (Eds.), 2003. *Generalized Estimating Equations*. Chapman & Hall/CRC.
- Harford, K.A., Reynolds, C.M., McGillicuddy, F.C., Roche, H.M., 2011. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *The Proceedings of the Nutrition Society* 70, 408-417.
- Harwood, H.J., Jr., 2012. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 63, 57-75.
- Hashizume, M., Masahiko, M., 2011. IL-6 and lipid metabolism. *Inflammation and regeneration* 31, 8.
- Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J., Martin, R.J., 2001. The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2, 239-254.
- He, Y., Hakvoort, T.B., Kohler, S.E., Vermeulen, J.L., de Waart, D.R., de Theije, C., ten Have, G.A., van Eijk,

Bibliografia

- H.M., Kunne, C., Labruyere, W.T., Houten, S.M., Sokolovic, M., Ruijter, J.M., Deutz, N.E., Lamers, W.H., 2010. Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification. *The Journal of biological chemistry* 285, 9516-9524.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., Schaper, F., 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 374, 1-20.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., Graeve, L., 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* 334 (Pt 2), 297-314.
- Heinrichs, S.C., Richard, D., 1999. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* 33, 350-359.
- Henry, S.L., Bensley, J.G., Wood-Bradley, R.J., Cullen-McEwen, L.A., Bertram, J.F., Armitage, J.A., 2012. White adipocytes: more than just fat depots. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 435-440.
- Herrada, G., Wolgemuth, D.J., 1997. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *Journal of cell science* 110 (Pt 14), 1543-1553.
- Heyser, C.J., Masliah, E., Samimi, A., Campbell, I.L., Gold, L.H., 1997. Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1500-1505.
- Hickner, R.C., Fisher, J.S., Hansen, P.A., Racette, S.B., Mier, C.M., Turner, M.J., Holloszy, J.O., 1997. Muscle glycogen accumulation after endurance exercise in trained and untrained individuals. *J Appl Physiol* 83, 897-903.
- Hidalgo, J., Florit, S., Giralt, M., Ferrer, B., Keller, C., Pilegaard, H., 2010. Transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-6 are resistant to high-fat diet-induced increases in body weight and body fat. *Brain, behavior, and immunity* 24, 119-126.
- Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K.H., Kishimoto, T., 1985. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 5490-5494.
- Hirota, H., Kiyama, H., Kishimoto, T., Taga, T., 1996. Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *The Journal of experimental medicine* 183, 2627-2634.
- Hoene, M., Weigert, C., 2008. The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 9, 20-29.
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J.S., Williams, L.M., Trayhurn, P., Mercer, J.G., 1997. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11073-11078.
- Holmes, A.G., Mesa, J.L., Neill, B.A., Chung, J., Carey, A.L., Steinberg, G.R., Kemp, B.E., Southgate, R.J.,

- Lancaster, G.I., Bruce, C.R., Watt, M.J., Febbraio, M.A., 2008. Prolonged interleukin-6 administration enhances glucose tolerance and increases skeletal muscle PPARalpha and UCP2 expression in rats. *The Journal of endocrinology* 198, 367-374.
- Holmes, A.G., Watt, M.J., Carey, A.L., Febbraio, M.A., 2004. Ionomycin, but not physiologic doses of epinephrine, stimulates skeletal muscle interleukin-6 mRNA expression and protein release. *Metabolism: clinical and experimental* 53, 1492-1495.
- Hong, F., Radaeva, S., Pan, H.N., Tian, Z., Veech, R., Gao, B., 2004. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 40, 933-941.
- Horiuchi, S., Ampofo, W., Koyanagi, Y., Yamashita, A., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, M., Yamamoto, N., 1998. High-level production of alternatively spliced soluble interleukin-6 receptor in serum of patients with adult T-cell leukaemia/HTLV-I-associated myelopathy. *Immunology* 95, 360-369.
- Horton, A.R., Barlett, P.F., Pennica, D., Davies, A.M., 1998. Cytokines promote the survival of mouse cranial sensory neurones at different developmental stages. *The European journal of neuroscience* 10, 673-679.
- Hotamisligil, G.S., 1999. The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *Journal of internal medicine* 245, 621-625.
- Hotamisligil, G.S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., Spiegelman, B.M., 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 95, 2409-2415.
- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., Spiegelman, B.M., 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665-668.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Brasseur, M., McKnight, S.L., 1994. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265, 1701-1706.
- Hu, F.B., Leitzmann, M.F., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., Rimm, E.B., 2001. Physical activity and television watching in relation to risk for type 2 diabetes mellitus in men. *Archives of internal medicine* 161, 1542-1548.
- Hu, G., Lindstrom, J., Valle, T.T., Eriksson, J.G., Jousilahti, P., Silventoinen, K., Qiao, Q., Tuomilehto, J., 2004. Physical activity, body mass index, and risk of type 2 diabetes in patients with normal or impaired glucose regulation. *Archives of internal medicine* 164, 892-896.
- Huang, X.F., Han, M., Storlien, L.H., 2003. The level of NPY receptor mRNA expression in diet-induced obese and resistant mice. *Brain research. Molecular brain research* 115, 21-28.
- Hug, C., Lodish, H.F., 2005. *Medicine*. Visfatin: a new adipokine. *Science* 307, 366-367.

Bibliografia

- Ihle, J.N., Kerr, I.M., 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in genetics* : TIG 11, 69-74.
- Imai, T., Jiang, M., Chambon, P., Metzger, D., 2001. Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 224-228.
- Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P., Metzger, D., 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic acids research* 27, 4324-4327.
- Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto, Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Notohara, K., Katayose, K., Okamura, H., Kahn, C.R., Noda, T., Takeda, K., Akira, S., Inui, A., Kasuga, M., 2006. Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell metabolism* 3, 267-275.
- Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Furukawa, K., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Teshigawara, K., Jin, S., Iguchi, H., Hiramatsu, R., LeRoith, D., Takeda, K., Akira, S., Kasuga, M., 2004. Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nature medicine* 10, 168-174.
- Jansson, J.O., Wallenius, K., Wernstedt, I., Ohlsson, C., Dickson, S.L., Wallenius, V., 2003. On the site and mechanism of action of the anti-obesity effects of interleukin-6. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 13 Suppl A, S28-32.
- Jansson, P.A., Larsson, A., Smith, U., Lonroth, P., 1994. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. *The Journal of clinical investigation* 93, 240-246.
- Jarskog, L.F., Xiao, H., Wilkie, M.B., Lauder, J.M., Gilmore, J.H., 1997. Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival in vitro. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 15, 711-716.
- Jirik, F.R., Podor, T.J., Hirano, T., Kishimoto, T., Loskutoff, D.J., Carson, D.A., Lotz, M., 1989. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol* 142, 144-147.
- Jong-Yeon, K., Hickner, R.C., Dohm, G.L., Houmard, J.A., 2002. Long- and medium-chain fatty acid oxidation is increased in exercise-trained human skeletal muscle. *Metabolism: clinical and experimental* 51, 460-464.
- Jonsdottir, I.H., Schjerling, P., Ostrowski, K., Asp, S., Richter, E.A., Pedersen, B.K., 2000. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *The Journal of physiology* 528 Pt 1, 157-163.
- Jorgensen, M.C., Ahnfelt-Ronne, J., Hald, J., Madsen, O.D., Serup, P., Hecksher-Sorensen, J., 2007. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocrine reviews* 28, 685-705.
- Jostock, T., Mullberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F., Rose-John, S.,

2001. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *European journal of biochemistry / FEBS* 268, 160-167.
- Jump, D.B., 2011. Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 14, 115-120.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D.G., 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism* 1, 15-25.
- Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J.L., Friedman, J.M., Charron, M.J., 1997. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389, 374-377.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., Kasuga, M., 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation* 116, 1494-1505.
- Kang, M.K., Kang, S.K., 2008. Interleukin-6 induces proliferation in adult spinal cord-derived neural progenitors via the JAK2/STAT3 pathway with EGF-induced MAPK phosphorylation. *Cell proliferation* 41, 377-392.
- Kariagina, A., Romanenko, D., Ren, S.G., Chesnokova, V., 2004. Hypothalamic-pituitary cytokine network. *Endocrinology* 145, 104-112.
- Kashiwagi, A., Verso, M.A., Andrews, J., Vasquez, B., Reaven, G., Foley, J.E., 1983. In vitro insulin resistance of human adipocytes isolated from subjects with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 72, 1246-1254.
- Keller, C., Hellsten, Y., Steensberg, A., Pedersen, B.K., 2006. Differential regulation of IL-6 and TNF-alpha via calcineurin in human skeletal muscle cells. *Cytokine* 36, 141-147.
- Keller, C., Steensberg, A., Hansen, A.K., Fischer, C.P., Plomgaard, P., Pedersen, B.K., 2005. Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 99, 2075-2079.
- Keller, C., Steensberg, A., Pilegaard, H., Osada, T., Saltin, B., Pedersen, B.K., Neufer, P.D., 2001. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 2748-2750.
- Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., Ranganathan, G., 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 280, E745-751.
- Kim, H.J., Higashimori, T., Park, S.Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y.J., Noh, H.L., Cho, Y.R., Cline, G., Kim, Y.B., Kim, J.K., 2004. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53, 1060-1067.
- Kishimoto, T., 2006. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis research & therapy* 8 Suppl 2, S2.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., Taga, T., 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86,

Bibliografia

1243-1254.

- Kiu, H., Nicholson, S.E., 2012. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* 30, 88-106.
- Klein, M.A., Moller, J.C., Jones, L.L., Bluethmann, H., Kreutzberg, G.W., Raivich, G., 1997. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* 19, 227-233.
- Klover, P.J., Zimmers, T.A., Koniaris, L.G., Mooney, R.A., 2003. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* 52, 2784-2789.
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., Kohler, G., 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339-342.
- Kordula, T., Rydel, R.E., Brigham, E.F., Horn, F., Heinrich, P.C., Travis, J., 1998. Oncostatin M and the interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor complex regulate alpha1-antichymotrypsin expression in human cortical astrocytes. *The Journal of biological chemistry* 273, 4112-4118.
- Kos, C.H., 2004. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutrition reviews* 62, 243-246.
- Koskinen, S.O., Wang, W., Ahtikoski, A.M., Kjaer, M., Han, X.Y., Komulainen, J., Kovanen, V., Takala, T.E., 2001. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 280, R1292-1300.
- Kozak, W., Kluger, M.J., Soszynski, D., Conn, C.A., Rudolph, K., Leon, L.R., Zheng, H., 1998. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 856, 33-47.
- Krief, S., Lonnqvist, F., Raimbault, S., Baude, B., Van Spronsen, A., Arner, P., Strosberg, A.D., Ricquier, D., Emorine, L.J., 1993. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *The Journal of clinical investigation* 91, 344-349.
- Kristiansen, O.P., Mandrup-Poulsen, T., 2005. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 54 Suppl 2, S114-124.
- Krogh-Madsen, R., Thyfault, J.P., Broholm, C., Mortensen, O.H., Olsen, R.H., Mounier, R., Plomgaard, P., van Hall, G., Booth, F.W., Pedersen, B.K., 2010. A 2-wk reduction of ambulatory activity attenuates peripheral insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 108, 1034-1040.
- Krook, A., 2008. IL-6 and metabolism-new evidence and new questions. *Diabetologia* 51, 1097-1099.
- Lagathu, C., Bastard, J.P., Auclair, M., Maachi, M., Capeau, J., Caron, M., 2003. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochemical and biophysical research communications* 311, 372-379.
- Lee, D.E., Kehlenbrink, S., Lee, H., Hawkins, M., Yudkin, J.S., 2009a. Getting the message across: mechanisms of physiological cross talk by adipose tissue. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 296, E1210-1229.

- Lee, H.K., Seo, I.A., Suh, D.J., Hong, J.I., Yoo, Y.H., Park, H.T., 2009b. Interleukin-6 is required for the early induction of glial fibrillary acidic protein in Schwann cells during Wallerian degeneration. *Journal of neurochemistry* 108, 776-786.
- Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., Berman, J.W., 1993. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150, 2659-2667.
- Lemonnier, D., 1972. Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *The Journal of clinical investigation* 51, 2907-2915.
- Leon, L.R., White, A.A., Kluger, M.J., 1998. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *The American journal of physiology* 275, R269-277.
- Leu, J.I., Crissey, M.A., Leu, J.P., Ciliberto, G., Taub, R., 2001. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Molecular and cellular biology* 21, 414-424.
- Li, G., Klein, R.L., Matheny, M., King, M.A., Meyer, E.M., Scarpace, P.J., 2002. Induction of uncoupling protein 1 by central interleukin-6 gene delivery is dependent on sympathetic innervation of brown adipose tissue and underlies one mechanism of body weight reduction in rats. *Neuroscience* 115, 879-889.
- Li, T.L., Gleeson, M., 2005. The effects of carbohydrate supplementation during the second of two prolonged cycling bouts on immunoendocrine responses. *European journal of applied physiology* 95, 391-399.
- Liang, H., Ward, W.F., 2006. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Advances in physiology education* 30, 145-151.
- Lieber, C.S., Leo, M.A., Mak, K.M., Xu, Y., Cao, Q., Ren, C., Ponomarenko, A., DeCarli, L.M., 2004. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of clinical nutrition* 79, 502-509.
- Lienenluke, B., Christ, B., 2007. Impact of interleukin-6 on the glucose metabolic capacity in rat liver. *Histochemistry and cell biology* 128, 371-377.
- Lieskovska, J., Guo, D., Derman, E., 2002. IL-6-overexpression brings about growth impairment potentially through a GH receptor defect. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 12, 388-398.
- Lillioja, S., Young, A.A., Culter, C.L., Ivy, J.L., Abbott, W.G., Zawadzki, J.K., Yki-Jarvinen, H., Christin, L., Secomb, T.W., Bogardus, C., 1987. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *The Journal of clinical investigation* 80, 415-424.
- Lin, S., Storlien, L.H., Huang, X.F., 2000a. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain research* 875, 89-95.
- Lin, S., Thomas, T.C., Storlien, L.H., Huang, X.F., 2000b. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 24, 639-646.
- Lin, Y., Berg, A.H., Iyengar, P., Lam, T.K., Giacca, A., Combs, T.P., Rajala, M.W., Du, X., Rollman, B., Li, W.,

Bibliografia

- Hawkins, M., Barzilai, N., Rhodes, C.J., Fantus, I.G., Brownlee, M., Scherer, P.E., 2005. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 280, 4617-4626.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., Shuai, K., 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10626-10631.
- Lokrantz, C.M., Uvnas-Moberg, K., Kaplan, J.M., 1997. Effects of central oxytocin administration on intraoral intake of glucose in deprived and nondeprived rats. *Physiology & behavior* 62, 347-352.
- Lonnqvist, F., Thorne, A., Large, V., Arner, P., 1997. Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 1472-1480.
- Ludvik, B., Nolan, J.J., Baloga, J., Sacks, D., Olefsky, J., 1995. Effect of obesity on insulin resistance in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetes* 44, 1121-1125.
- Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 2001. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 107, 379-386.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* 117, 175-184.
- Lutticken, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T., et al., 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263, 89-92.
- Lyngso, D., Simonsen, L., Bulow, J., 2002. Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue. *The Journal of physiology* 543, 379-386.
- Ma, J., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Tan, A.L., Cao, X., 2003. A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation. *The Journal of biological chemistry* 278, 29252-29260.
- Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P.C., Rose-John, S., 1992. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J Immunol* 149, 2021-2027.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., et al., 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine* 1, 1155-1161.
- Magee, W., 1962. Relationship between Daily Feed Consumption and Feed Efficiency. *Journal of Animal Science* 21.
- Malik, R.C., 1984. Genetic and physiological aspects of growth, body composition and feed efficiency in mice: a review. *J Anim Sci* 58, 577-590.
- Manabe, Y., Gollisch, K.S., Holton, L., Kim, Y.B., Brandauer, J., Fujii, N.L., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., 2013. Exercise training-induced adaptations associated with increases in skeletal muscle glycogen content. *The FEBS journal* 280, 916-926.

- Marz, P., Cheng, J.G., Gadiant, R.A., Patterson, P.H., Stoyan, T., Otten, U., Rose-John, S., 1998. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3251-3256.
- Mas, E., Danjoux, M., Garcia, V., Carpentier, S., Segui, B., Levade, T., 2009. IL-6 deficiency attenuates murine diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS one* 4, e7929.
- Matthews, V., Schuster, B., Schutze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.J., Rose-John, S., 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *The Journal of biological chemistry* 278, 38829-38839.
- Matthews, V.B., Allen, T.L., Risis, S., Chan, M.H., Henstridge, D.C., Watson, N., Zaffino, L.A., Babb, J.R., Boon, J., Meikle, P.J., Jowett, J.B., Watt, M.J., Jansson, J.O., Bruce, C.R., Febbraio, M.A., 2010. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia* 53, 2431-2441.
- May, L.T., Ghrayeb, J., Santhanam, U., Tatter, S.B., Sthoeger, Z., Helfgott, D.C., Chiorazzi, N., Griener, G., Sehgal, P.B., 1988. Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *The Journal of biological chemistry* 263, 7760-7766.
- McBride, K.M., Banninger, G., McDonald, C., Reich, N.C., 2002. Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *The EMBO journal* 21, 1754-1763.
- McCulloch, C.E., Shayle, R.S. (Eds.), 2001. *Generalized linear and mixed models*. John Wiley & Sons, New York.
- McLoughlin, R.M., Witowski, J., Robson, R.L., Wilkinson, T.S., Hurst, S.M., Williams, A.S., Williams, J.D., Rose-John, S., Jones, S.A., Topley, N., 2003. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *The Journal of clinical investigation* 112, 598-607.
- Mead, J.R., Irvine, S.A., Ramji, D.P., 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)* 80, 753-769.
- Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., Winder, W.W., 1997. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *The American journal of physiology* 273, E1107-1112.
- Meshkani, R., Adeli, K., 2009. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clinical biochemistry* 42, 1331-1346.
- Metzger, D., Chambon, P., 2001. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24, 71-80.
- Meyer, T., Begitt, A., Lodige, I., van Rossum, M., Vinkemeier, U., 2002. Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *The EMBO journal* 21, 344-354.
- Meyer, T., Vinkemeier, U., 2007. STAT nuclear translocation: potential for pharmacological intervention. *Expert opinion on therapeutic targets* 11, 1355-1365.

Bibliografia

- Milner, R., Campbell, I.L., 2006. Increased expression of the beta4 and alpha5 integrin subunits in cerebral blood vessels of transgenic mice chronically producing the pro-inflammatory cytokines IL-6 or IFN-alpha in the central nervous system. *Molecular and cellular neurosciences* 33, 429-440.
- Miller, J.F., Mitchell, G.F., 1968. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 128, 801-820.
- Mistry, A.M., Swick, A.G., Romsos, D.R., 1997. Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/ob mice. *The Journal of nutrition* 127, 2065-2072.
- Mix, H., Widjaja, A., Jandl, O., Cornberg, M., Kaul, A., Goke, M., Beil, W., Kuske, M., Brabant, G., Manns, M.P., Wagner, S., 2000. Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut* 47, 481-486.
- Miyahara, S., Komori, T., Fujiwara, R., Shizuya, K., Yamamoto, M., Ohmori, M., Okazaki, Y., 2000. Effects of repeated stress on expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor mRNAs in rat hypothalamus and midbrain. *Life sciences* 66, PL93-98.
- Mizuno, T.M., Kleopoulos, S.P., Bergen, H.T., Roberts, J.L., Priest, C.A., Mobbs, C.V., 1998. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47, 294-297.
- Mizuno, T.M., Mobbs, C.V., 1999. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* 140, 814-817.
- Mock, B.A., Nordan, R.P., Justice, M.J., Kozak, C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Clark, S.C., Wong, G.G., Rudikoff, S., 1989. The murine Il-6 gene maps to the proximal region of chromosome 5. *J Immunol* 142, 1372-1376.
- Modur, V., Li, Y., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., McIntyre, T.M., 1997. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *The Journal of clinical investigation* 100, 2752-2756.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D.R., Miles, J.M., Yudkin, J.S., Klein, S., Coppack, S.W., 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 4196-4200.
- Moldoveanu, A.I., Shephard, R.J., Shek, P.N., 2000. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 89, 1499-1504.
- Mooney, R.A., 2007. Counterpoint: Interleukin-6 does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol* 102, 816-818; discussion 818-819.
- Morrow, J.D., Opp, M.R., 2005. Sleep-wake behavior and responses of interleukin-6-deficient mice to sleep deprivation. *Brain, behavior, and immunity* 19, 28-39.
- Mounier, R., Lantier, L., Leclerc, J., Sotiropoulos, A., Pende, M., Daegelen, D., Sakamoto, K., Foretz, M., Viollet, B., 2009. Important role for AMPKalpha1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 2264-2273.

- Mui, A.L., Wakao, H., Harada, N., O'Farrell, A.M., Miyajima, A., 1995. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-5 transduce signals through two forms of STAT5. *Journal of leukocyte biology* 57, 799-803.
- Mullberg, J., Dittrich, E., Graeve, L., Gerhartz, C., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Heinrich, P.C., Rose-John, S., 1993. Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS letters* 332, 174-178.
- Muraguchi, A., Kishimoto, T., Miki, Y., Kuritani, T., Kaieda, T., Yoshizaki, K., Yamamura, Y., 1981. T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J Immunol* 127, 412-416.
- Murphy, P.G., Borthwick, L.A., Altares, M., Gaudie, J., Kaplan, D., Richardson, P.M., 2000. Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. *The European journal of neuroscience* 12, 1891-1899.
- Murphy, P.G., Ramer, M.S., Borthwick, L., Gaudie, J., Richardson, P.M., Bisby, M.A., 1999. Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. *The European journal of neuroscience* 11, 2243-2253.
- Musso, T., Johnston, J.A., Linnekin, D., Varesio, L., Rowe, T.K., O'Shea, J.J., McVicar, D.W., 1995. Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2, 4, and 7. *The Journal of experimental medicine* 181, 1425-1431.
- Myllyla, R., Salminen, A., Peltonen, L., Takala, T.E., Vihko, V., 1986. Collagen metabolism of mouse skeletal muscle during the repair of exercise injuries. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 407, 64-70.
- Nakanishi, M., Niidome, T., Matsuda, S., Akaike, A., Kihara, T., Sugimoto, H., 2007. Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *The European journal of neuroscience* 25, 649-658.
- Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G.D., Taga, T., Kishimoto, T., 1993. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 82, 1120-1126.
- Naugler, W.E., Karin, M., 2008. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in molecular medicine* 14, 109-119.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B., 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293, E444-452.
- Nehlsen-Cannarella, S.L., Fagoaga, O.R., Nieman, D.C., Henson, D.A., Butterworth, D.E., Schmitt, R.L., Bailey, E.M., Warren, B.J., Utter, A., Davis, J.M., 1997. Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol* 82, 1662-1667.
- Nelson, T.E., Campbell, I.L., Gruol, D.L., 1999. Altered physiology of Purkinje neurons in cerebellar slices from transgenic mice with chronic central nervous system expression of interleukin-6. *Neuroscience* 89, 127-136.

Bibliografia

- Nielsen, S., Pedersen, B.K., 2008. Skeletal muscle as an immunogenic organ. *Current opinion in pharmacology* 8, 346-351.
- Nieman, D.C., Davis, J.M., Brown, V.A., Henson, D.A., Dumke, C.L., Utter, A.C., Vinci, D.M., Downs, M.F., Smith, J.C., Carson, J., Brown, A., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., 2004. Influence of carbohydrate ingestion on immune changes after 2 h of intensive resistance training. *J Appl Physiol* 96, 1292-1298.
- Nieman, D.C., Davis, J.M., Henson, D.A., Walberg-Rankin, J., Shute, M., Dumke, C.L., Utter, A.C., Vinci, D.M., Carson, J.A., Brown, A., Lee, W.J., McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., 2003. Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. *J Appl Physiol* 94, 1917-1925.
- Nordan, R.P., Pumphrey, J.G., Rudikoff, S., 1987. Purification and NH₂-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1. *J Immunol* 139, 813-817.
- Northemann, W., Braciak, T.A., Hattori, M., Lee, F., Fey, G.H., 1989. Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *The Journal of biological chemistry* 264, 16072-16082.
- Obici, S., Feng, Z., Karknias, G., Baskin, D.G., Rossetti, L., 2002. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature neuroscience* 5, 566-572.
- Odemis, V., Moepps, B., Gierschik, P., Engele, J., 2002. Interleukin-6 and cAMP induce stromal cell-derived factor-1 chemotaxis in astroglia by up-regulating CXCR4 cell surface expression. Implications for brain inflammation. *The Journal of biological chemistry* 277, 39801-39808.
- Oh, J.W., Revel, M., Chebath, J., 1996. A soluble interleukin 6 receptor isolated from conditioned medium of human breast cancer cells is encoded by a differentially spliced mRNA. *Cytokine* 8, 401-409.
- Oh, J.W., Van Wagoner, N.J., Rose-John, S., Benveniste, E.N., 1998. Role of IL-6 and the soluble IL-6 receptor in inhibition of VCAM-1 gene expression. *J Immunol* 161, 4992-4999.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S., Pedersen, B.K., 1998. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *The Journal of physiology* 508 (Pt 3), 949-953.
- Ostrowski, K., Schjerling, P., Pedersen, B.K., 2000. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *European journal of applied physiology* 83, 512-515.
- Ozbek, S., Grotzinger, J., Krebs, B., Fischer, M., Wollmer, A., Jostock, T., Mullberg, J., Rose-John, S., 1998. The membrane proximal cytokine receptor domain of the human interleukin-6 receptor is sufficient for ligand binding but not for gp130 association. *The Journal of biological chemistry* 273, 21374-21379.
- Pang, Y., Fan, L.W., Zheng, B., Cai, Z., Rhodes, P.G., 2006. Role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced brain injury and behavioral dysfunction in neonatal rats. *Neuroscience* 141, 745-755.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 272, 29911-29918.

- Pedersen, B.K., 2009. The disease of physical inactivity--and the role of myokines in muscle--fat cross talk. *The Journal of physiology* 587, 5559-5568.
- Pedersen, B.K., 2011. Muscles and their myokines. *The Journal of experimental biology* 214, 337-346.
- Pedersen, B.K., Akerstrom, T.C., Nielsen, A.R., Fischer, C.P., 2007. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* 103, 1093-1098.
- Pedersen, B.K., Febbraio, M.A., 2007. Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol* 102, 814-816.
- Pedersen, B.K., Febbraio, M.A., 2008. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews* 88, 1379-1406.
- Pedersen, B.K., Febbraio, M.A., 2012. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature reviews. Endocrinology* 8, 457-465.
- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., Febbraio, M., Saltin, B., 2003. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *Journal of muscle research and cell motility* 24, 113-119.
- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Schjerling, P., 2001. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *The Journal of physiology* 536, 329-337.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., Collins, F., 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540-543.
- Perez de Heredia, F., Wood, I.S., Trayhurn, P., 2010. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 459, 509-518.
- Peruzzo, B., Pastor, F.E., Blazquez, J.L., Schobitz, K., Pelaez, B., Amat, P., Rodriguez, E.M., 2000. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 132, 10-26.
- Peters, M., Muller, A.M., Rose-John, S., 1998. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 92, 3495-3504.
- Petersen, A.M., Pedersen, B.K., 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98, 1154-1162.
- Petersen, E.W., Carey, A.L., Sacchetti, M., Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., 2005. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 288, E155-162.
- Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R., Shulman, G.I., 2004. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 350, 664-671.
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2010. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing

Bibliografía

- adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 285, 7153-7164.
- Phillips, S.M., Green, H.J., Tarnopolsky, M.A., Heigenhauser, G.F., Hill, R.E., Grant, S.M., 1996. Effects of training duration on substrate turnover and oxidation during exercise. *J Appl Physiol* 81, 2182-2191.
- Pickup, J.C., Mattock, M.B., Chusney, G.D., Burt, D., 1997. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40, 1286-1292.
- Plomgaard, P., Penkowa, M., Pedersen, B.K., 2005. Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles. *Exercise immunology review* 11, 53-63.
- Polonsky, K.S., Given, B.D., Van Cauter, E., 1988. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *The Journal of clinical investigation* 81, 442-448.
- Postic, C., Dentin, R., Girard, J., 2004. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes & metabolism* 30, 398-408.
- Putman, C.T., Jones, N.L., Hultman, E., Hollidge-Horvat, M.G., Bonen, A., McConachie, D.R., Heigenhauser, G.J., 1998. Effects of short-term submaximal training in humans on muscle metabolism in exercise. *The American journal of physiology* 275, E132-139.
- Quintana, A., Erta, M., Ferrer, B., Comes, G., Giral, M., Hidalgo, J., 2013. Astrocyte-specific deficiency of interleukin-6 and its receptor reveal specific roles in survival, body weight and behavior. *Brain, behavior, and immunity* 27, 162-173.
- Quintana, A., Molinero, A., Borup, R., Nielsen, F.C., Campbell, I.L., Penkowa, M., Hidalgo, J., 2008. Effect of astrocyte-targeted production of IL-6 on traumatic brain injury and its impact on the cortical transcriptome. *Developmental neurobiology* 68, 195-208.
- Rabinowitz, D., Zierler, K.L., 1962. Forearm metabolism in obesity and its response to intra-arterial insulin. Characterization of insulin resistance and evidence for adaptive hyperinsulinism. *The Journal of clinical investigation* 41, 2173-2181.
- Rahmouni, K., Sigmund, C.D., Haynes, W.G., Mark, A.L., 2009. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes* 58, 536-542.
- Rajala, M.W., Scherer, P.E., 2003. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144, 3765-3773.
- Ramer, M.S., Murphy, P.G., Richardson, P.M., Bisby, M.A., 1998. Spinal nerve lesion-induced mechanoallodynia and adrenergic sprouting in sensory ganglia are attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Pain* 78, 115-121.
- Raposo, P.D., Pierroz, D.D., Broqua, P., White, R.B., Pedrazzini, T., Aubert, M.L., 2001. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. *Molecular and cellular endocrinology* 185, 195-204.
- Richard, D., Lin, Q., Timofeeva, E., 2002. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *European journal of pharmacology* 440,

189-197.

- Rieusset, J., Bouzakri, K., Chevillotte, E., Ricard, N., Jacquet, D., Bastard, J.P., Laville, M., Vidal, H., 2004. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53, 2232-2241.
- Ringheim, G.E., Burgher, K.L., Heroux, J.A., 1995. Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain. *Journal of neuroimmunology* 63, 113-123.
- Ropelle, E.R., Flores, M.B., Cintra, D.E., Rocha, G.Z., Pauli, J.R., Morari, J., de Souza, C.T., Moraes, J.C., Prada, P.O., Guadagnini, D., Marin, R.M., Oliveira, A.G., Augusto, T.M., Carvalho, H.F., Velloso, L.A., Saad, M.J., Carvalheira, J.B., 2010. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS biology* 8.
- Rose-John, S., Heinrich, P.C., 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *The Biochemical journal* 300 (Pt 2), 281-290.
- Ross, S.R., Graves, R.A., Spiegelman, B.M., 1993. Targeted expression of a toxin gene to adipose tissue: transgenic mice resistant to obesity. *Genes & development* 7, 1318-1324.
- Rotter, V., Nagaev, I., Smith, U., 2003. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *The Journal of biological chemistry* 278, 45777-45784.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386.
- Rupnick, M.A., Panigrahy, D., Zhang, C.Y., Dallabrida, S.M., Lowell, B.B., Langer, R., Folkman, M.J., 2002. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10730-10735.
- Sadagurski, M., Norquay, L., Farhang, J., D'Aquino, K., Copps, K., White, M.F., 2010. Human IL6 enhances leptin action in mice. *Diabetologia* 53, 525-535.
- Saltiel, A.R., 2012. Insulin resistance in the defense against obesity. *Cell metabolism* 15, 798-804.
- Sallmann, S., Juttler, E., Prinz, S., Petersen, N., Knopf, U., Weiser, T., Schwaninger, M., 2000. Induction of interleukin-6 by depolarization of neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 8637-8642.
- Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J., Shulman, G.I., 2004. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of biological chemistry* 279, 32345-32353.
- Saper, C.B., Chou, T.C., Elmquist, J.K., 2002. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36, 199-211.
- Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J.A., Yoshimura, A., 1999. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 4, 339-351.

Bibliografia

- Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Kaziro, Y., 1988. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Molecular and cellular biology* 8, 3546-3549.
- Schafer, K.H., Mestres, P., Marz, P., Rose-John, S., 1999. The IL-6/sIL-6R fusion protein hyper-IL-6 promotes neurite outgrowth and neuron survival in cultured enteric neurons. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 19, 527-532.
- Schele, E., Fekete, C., Egri, P., Fuzesi, T., Palkovits, M., Keller, E., Liposits, Z., Gereben, B., Karlsson-Lindahl, L., Shao, R., Jansson, J.O., 2012. Interleukin-6 receptor alpha is co-localised with melanin-concentrating hormone in human and mouse hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology* 24, 930-943.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 878-888.
- Scheller, J., Rose-John, S., 2006. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Medical microbiology and immunology* 195, 173-183.
- Schindler, C., Fu, X.Y., Improta, T., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr., 1992. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7836-7839.
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S.C., Dinarello, C.A., 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75, 40-47.
- Schobitz, B., Pezeshki, G., Pohl, T., Hemmann, U., Heinrich, P.C., Holsboer, F., Reul, J.M., 1995. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 659-664.
- Schuster, B., Meinert, W., Rose-John, S., Kallen, K.J., 2003. The human interleukin-6 (IL-6) receptor exists as a preformed dimer in the plasma membrane. *FEBS letters* 538, 113-116.
- Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E.J., Porte, D., Jr., 1996. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature medicine* 2, 589-593.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P., Baskin, D.G., 1997. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46, 2119-2123.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., Baskin, D.G., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Sehgal, P.B., Zilberstein, A., Ruggieri, R.M., May, L.T., Ferguson-Smith, A., Slate, D.L., Revel, M., Ruddle, F.H., 1986. Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5219-5222.
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T., Yoneda, Y., 1997. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *The EMBO journal* 16, 7067-7077.

- Selmaj, K.W., Farooq, M., Norton, W.T., Raine, C.S., Brosnan, C.F., 1990. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol* 144, 129-135.
- Senaris, R.M., Trujillo, M.L., Navia, B., Comes, G., Ferrer, B., Giralt, M., Hidalgo, J., 2011. Interleukin-6 regulates the expression of hypothalamic neuropeptides involved in body weight in a gender-dependent way. *Journal of neuroendocrinology* 23, 675-686.
- Senn, J.J., Klover, P.J., Nowak, I.A., Mooney, R.A., 2002. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51, 3391-3399.
- Serrano, A.L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardi, M., Munoz-Canoves, P., 2008. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell metabolism* 7, 33-44.
- Shi, H., Seeley, R.J., Clegg, D.J., 2009. Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Frontiers in neuroendocrinology* 30, 396-404.
- Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 1998. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396, 670-674.
- Shirae, T., Chen, H., Morris, M.J., 2009. Differential effects of restricted versus unlimited high-fat feeding in rats on fat mass, plasma hormones and brain appetite regulators. *Journal of neuroendocrinology* 21, 602-609.
- Shoelson, S.E., Herrero, L., Naaz, A., 2007. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169-2180.
- Shoelson, S.E., Lee, J., Goldfine, A.B., 2006. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 116, 1793-1801.
- Shrikant, P., Weber, E., Jilling, T., Benveniste, E.N., 1995. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *J Immunol* 155, 1489-1501.
- Simpson, R.J., Hammacher, A., Smith, D.K., Matthews, J.M., Ward, L.D., 1997. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein science : a publication of the Protein Society* 6, 929-955.
- Sipols, A.J., Baskin, D.G., Schwartz, M.W., 1995. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44, 147-151.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., Hauner, H., 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 1023-1033.
- Small, C.J., Liu, Y.L., Stanley, S.A., Connoley, I.P., Kennedy, A., Stock, M.J., Bloom, S.R., 2003. Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 27, 530-533.
- Smith-Kirwin, S.M., O'Connor, D.M., De Johnston, J., Lancey, E.D., Hassink, S.G., Funanage, V.L., 1998. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83, 1810-1813.

Bibliografia

- Somers, W., Stahl, M., Sehra, J.S., 1997. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *The EMBO journal* 16, 989-997.
- Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., Gerlo, S., 2011. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain research reviews* 67, 157-183.
- Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., et al., 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263, 92-95.
- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr., Yancopoulos, G.D., 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, 1349-1353.
- Stark, G.R., Darnell, J.E., Jr., 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36, 503-514.
- Starkie, R., Ostrowski, S.R., Jauffred, S., Febbraio, M., Pedersen, B.K., 2003. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 884-886.
- Starkie, R.L., Angus, D.J., Rolland, J., Hargreaves, M., Febbraio, M.A., 2000. Effect of prolonged, submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. *The Journal of physiology* 528, 647-655.
- Starkie, R.L., Arkinstall, M.J., Koukoulas, I., Hawley, J.A., Febbraio, M.A., 2001a. Carbohydrate ingestion attenuates the increase in plasma interleukin-6, but not skeletal muscle interleukin-6 mRNA, during exercise in humans. *The Journal of physiology* 533, 585-591.
- Starkie, R.L., Rolland, J., Angus, D.J., Anderson, M.J., Febbraio, M.A., 2001b. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *American journal of physiology. Cell physiology* 280, C769-774.
- Starnes, H.F., Jr., Pearce, M.K., Tewari, A., Yim, J.H., Zou, J.C., Abrams, J.S., 1990. Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal *Escherichia coli* infection and lethal tumor necrosis factor-alpha challenge in mice. *J Immunol* 145, 4185-4191.
- Steensberg, A., Febbraio, M.A., Osada, T., Schjerling, P., van Hall, G., Saltin, B., Pedersen, B.K., 2001. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *The Journal of physiology* 537, 633-639.
- Steensberg, A., Fischer, C.P., Keller, C., Moller, K., Pedersen, B.K., 2003a. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 285, E433-437.
- Steensberg, A., Fischer, C.P., Sacchetti, M., Keller, C., Osada, T., Schjerling, P., van Hall, G., Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., 2003b. Acute interleukin-6 administration does not impair muscle glucose uptake or whole-body glucose disposal in healthy humans. *The Journal of physiology* 548, 631-638.
- Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R.L., Osada, T., Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., 2002. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283, E1272-1278.

- Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., Klarlund Pedersen, B., 2000. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *The Journal of physiology* 529 Pt 1, 237-242.
- Stenlof, K., Wernstedt, I., Fjallman, T., Wallenius, V., Wallenius, K., Jansson, J.O., 2003. Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 4379-4383.
- Suzuki, K., Yamada, M., Kurakake, S., Okamura, N., Yamaya, K., Liu, Q., Kudoh, S., Kowatari, K., Nakaji, S., Sugawara, K., 2000. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *European journal of applied physiology* 81, 281-287.
- Sweet, D.C., Levine, A.S., Billington, C.J., Kotz, C.M., 1999. Feeding response to central orexins. *Brain research* 821, 535-538.
- Taga, T., Kishimoto, T., 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual review of immunology* 15, 797-819.
- Tanabe, O., Akira, S., Kamiya, T., Wong, G.G., Hirano, T., Kishimoto, T., 1988. Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J Immunol* 141, 3875-3881.
- Tanaka, M., Kishimura, M., Ozaki, S., Osakada, F., Hashimoto, H., Okubo, M., Murakami, M., Nakao, K., 2000. Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* 106, 137-144.
- Tang-Christensen, M., Havel, P.J., Jacobs, R.R., Larsen, P.J., Cameron, J.L., 1999. Central administration of leptin inhibits food intake and activates the sympathetic nervous system in rhesus macaques. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84, 711-717.
- Tanner, C.J., Barakat, H.A., Dohm, G.L., Pories, W.J., MacDonald, K.G., Cunningham, P.R., Swanson, M.S., Houmard, J.A., 2002. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 282, E1191-1196.
- Tchkonia, T., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Thomou, T., DePonte, M., Koo, A., Forse, R.A., Chinnappan, D., Martin-Ruiz, C., von Zglinicki, T., Kirkland, J.L., 2006. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* 55, 2571-2578.
- Tenhumberg, S., Schuster, B., Zhu, L., Kovaleva, M., Scheller, J., Kallen, K.J., Rose-John, S., 2006. gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochemical and biophysical research communications* 346, 649-657.
- Thier, M., Marz, P., Otten, U., Weis, J., Rose-John, S., 1999. Interleukin-6 (IL-6) and its soluble receptor support survival of sensory neurons. *Journal of neuroscience research* 55, 411-422.
- Thomas, K.R., Capecchi, M.R., 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Tilgner, J., Volk, B., Kaltschmidt, C., 2001. Continuous interleukin-6 application in vivo via macroencapsulation of interleukin-6-expressing COS-7 cells induces massive gliosis. *Glia* 35, 234-245.

Bibliografía

- Toft, A.D., Thorn, M., Ostrowski, K., Asp, S., Moller, K., Iversen, S., Hermann, C., Sondergaard, S.R., Pedersen, B.K., 2000. N-3 polyunsaturated fatty acids do not affect cytokine response to strenuous exercise. *J Appl Physiol* 89, 2401-2406.
- Trautwein, C., Rakemann, T., Niehof, M., Rose-John, S., Manns, M.P., 1996. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology* 110, 1854-1862.
- Trayhurn, P., Beattie, J.H., 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *The Proceedings of the Nutrition Society* 60, 329-339.
- Trayhurn, P., Drevon, C.A., Eckel, J., 2011. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Archives of physiology and biochemistry* 117, 47-56.
- Trayhurn, P., Wood, I.S., 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British journal of nutrition* 92, 347-355.
- Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A., Warman, M.L., 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29, 52, 54.
- Trujillo, M.E., Scherer, P.E., 2006. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocrine reviews* 27, 762-778.
- Trujillo, M.E., Sullivan, S., Harten, I., Schneider, S.H., Greenberg, A.S., Fried, S.K., 2004. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 5577-5582.
- Tsigos, C., Papanicolaou, D.A., Kyrou, I., Defensor, R., Mitsiadis, C.S., Chrousos, G.P., 1997. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 4167-4170.
- Tunstall, R.J., Mehan, K.A., Wadley, G.D., Collier, G.R., Bonen, A., Hargreaves, M., Cameron-Smith, D., 2002. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283, E66-72.
- Ullum, H., Haahr, P.M., Diamant, M., Palmo, J., Halkjaer-Kristensen, J., Pedersen, B.K., 1994. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol* 77, 93-97.
- Valerio, A., Ferrario, M., Dreano, M., Garotta, G., Spano, P., Pizzi, M., 2002. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor/IL-6 fusion protein enhances in vitro differentiation of purified rat oligodendroglial lineage cells. *Molecular and cellular neurosciences* 21, 602-615.
- Vallieres, L., Campbell, I.L., Gage, F.H., Sawchenko, P.E., 2002. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 486-492.
- Vallieres, L., Rivest, S., 1999. Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia. *Endocrinology* 140, 3890-3903.

- van Hall, G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock, N., Moller, K., Saltin, B., Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., 2003. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 3005-3010.
- Van Snick, J., 1990. Interleukin-6: an overview. *Annual review of immunology* 8, 253-278.
- Varghese, J.N., Moritz, R.L., Lou, M.Z., Van Donkelaar, A., Ji, H., Ivancic, N., Branson, K.M., Hall, N.E., Simpson, R.J., 2002. Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15959-15964.
- Vella, C.A., Kravitz, L., 2002. Gender differences in fat metabolism. *IDEA, Health & Fitness Source* 20, 36-46.
- Verbsky, J.W., Bach, E.A., Fang, Y.F., Yang, L., Randolph, D.A., Fields, L.E., 1996. Expression of Janus kinase 3 in human endothelial and other non-lymphoid and non-myeloid cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 13976-13980.
- Vollmer, P., Oppmann, B., Voltz, N., Fischer, M., Rose-John, S., 1999. A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. *Intracellular protein transport and shedding. European journal of biochemistry / FEBS* 263, 438-446.
- von Coelln, R., Unsicker, K., Kriegstein, K., 1995. Screening of interleukins for survival-promoting effects on cultured mesencephalic dopaminergic neurons from embryonic rat brain. *Brain research. Developmental brain research* 89, 150-154.
- Wagner, J.A., 1996. Is IL-6 both a cytokine and a neurotrophic factor? *The Journal of experimental medicine* 183, 2417-2419.
- Wajchenberg, B.L., 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine reviews* 21, 697-738.
- Wallenius, K., Wallenius, V., Sunter, D., Dickson, S.L., Jansson, J.O., 2002a. Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 293, 560-565.
- Wallenius, V., Wallenius, K., Ahren, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S.L., Ohlsson, C., Jansson, J.O., 2002b. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature medicine* 8, 75-79.
- Wang, B., Wood, I.S., Trayhurn, P., 2007. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 455, 479-492.
- Wang, H., Eckel, R.H., 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 297, E271-288.
- Wang, M.Y., Lee, Y., Unger, R.H., 1999. Novel form of lipolysis induced by leptin. *The Journal of biological chemistry* 274, 17541-17544.
- Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowaska, D.E., Wang, X.M., McBay, D.L., Neville, W.A., Tadayon, M., Pickavance, L., Dryden, S., Thomas, M.E., McHale, M.T., Gloyer, I.S., Wilson, S., Buckingham, R., Arch, J.R., Trayhurn, P., Williams, G., 1997. Interactions between leptin and

Bibliografia

- hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* 46, 335-341.
- Wang, X., Lupardus, P., Laporte, S.L., Garcia, K.C., 2009. Structural biology of shared cytokine receptors. *Annual review of immunology* 27, 29-60.
- Wang, X., Spandidos, A., Wang, H., Seed, B., 2012. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic acids research* 40, D1144-1149.
- Wang, Y.X., Zhang, C.L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H., Evans, R.M., 2004. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS biology* 2, e294.
- Wang, Z.V., Deng, Y., Wang, Q.A., Sun, K., Scherer, P.E., 2010. Identification and characterization of a promoter cassette conferring adipocyte-specific gene expression. *Endocrinology* 151, 2933-2939.
- Wannamethee, S.G., Lowe, G.D., Rumley, A., Cherry, L., Whincup, P.H., Sattar, N., 2007. Adipokines and risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes care* 30, 1200-1205.
- Weigert, C., Brodbeck, K., Staiger, H., Kausch, C., Machicao, F., Haring, H.U., Schleicher, E.D., 2004. Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *The Journal of biological chemistry* 279, 23942-23952.
- Weigle, D.S., Bukowski, T.R., Foster, D.C., Holderman, S., Kramer, J.M., Lasser, G., Lofton-Day, C.E., Prunkard, D.E., Raymond, C., Kuijper, J.L., 1995. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *The Journal of clinical investigation* 96, 2065-2070.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., Jr., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 112, 1796-1808.
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation* 115, 1111-1119.
- Wernstedt, I., Edgley, A., Berndtsson, A., Faldt, J., Bergstrom, G., Wallenius, V., Jansson, J.O., 2006. Reduced stress- and cold-induced increase in energy expenditure in interleukin-6-deficient mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291, R551-557.
- West, A.K., Hidalgo, J., Eddins, D., Levin, E.D., Aschner, M., 2008. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology* 29, 489-503.
- Westerbacka, J., Lammi, K., Hakkinen, A.M., Rissanen, A., Salminen, I., Aro, A., Yki-Jarvinen, H., 2005. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90, 2804-2809.
- White, M.F., 1997. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2, S2-17.
- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., Sundler, F., 2002. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory peptides* 107, 63-69.
- Wiesinger, M.Y., Haan, S., Wuller, S., Kauffmann, M.E., Recker, T., Kuster, A., Heinrich, P.C., Muller-Newen,

- G., 2009. Development of an IL-6 inhibitor based on the functional analysis of murine IL-6Ralpha(1). *Chemistry & biology* 16, 783-794.
- Woiciechowsky, C., Schoning, B., Stoltenburg-Didinger, G., Stockhammer, F., Volk, H.D., 2004. Brain-IL-1 beta triggers astrogliosis through induction of IL-6: inhibition by propranolol and IL-10. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 10, BR325-330.
- Wolsk, E., Mygind, H., Grondahl, T.S., Pedersen, B.K., van Hall, G., 2010. IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 299, E832-840.
- Wong, H., Schotz, M.C., 2002. The lipase gene family. *Journal of lipid research* 43, 993-999.
- Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S.C., Lemarchand, P., Ferre, P., Foufelle, F., Carling, D., 2000. Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Molecular and cellular biology* 20, 6704-6711.
- Woods, S.C., D'Alessio, D.A., 2008. Central control of body weight and appetite. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93, S37-50.
- Woods, S.C., Gotoh, K., Clegg, D.J., 2003. Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 1175-1180.
- Wu, M., Dumalska, I., Morozova, E., van den Pol, A., Alreja, M., 2009. Melanin-concentrating hormone directly inhibits GnRH neurons and blocks kisspeptin activation, linking energy balance to reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 17217-17222.
- Wunderlich, F.T., Strohle, P., Konner, A.C., Gruber, S., Tovar, S., Bronneke, H.S., Juntti-Berggren, L., Li, L.S., van Rooijen, N., Libert, C., Berggren, P.O., Bruning, J.C., 2010. Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action. *Cell metabolism* 12, 237-249.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X.F., Achong, M.K., 1998. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation* 101, 311-320.
- Xu, B., Li, B.H., Rowland, N.E., Kalra, S.P., 1995. Neuropeptide Y injection into the fourth cerebroventricle stimulates c-Fos expression in the paraventricular nucleus and other nuclei in the forebrain: effect of food consumption. *Brain research* 698, 227-231.
- Xu, G.Y., Yu, H.A., Hong, J., Stahl, M., McDonagh, T., Kay, L.E., Cumming, D.A., 1997. Solution structure of recombinant human interleukin-6. *Journal of molecular biology* 268, 468-481.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 112, 1821-1830.
- Yakar, S., Nunez, N.P., Pennisi, P., Brodt, P., Sun, H., Fallavollita, L., Zhao, H., Scavo, L., Novosyadlyy, R., Kurshan, N., Stannard, B., East-Palmer, J., Smith, N.C., Perkins, S.N., Fuchs-Young, R., Barrett, J.C., Hursting, S.D., LeRoith, D., 2006. Increased tumor growth in mice with diet-induced obesity: impact

Bibliografia

- of ovarian hormones. *Endocrinology* 147, 5826-5834.
- Yamaguchi, K., Itoh, Y., Yokomizo, C., Nishimura, T., Niimi, T., Fujii, H., Okanou, T., Yoshikawa, T., 2010. Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline-deficient diet-fed mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90, 1169-1178.
- Yamamoto, K., Quelle, F.W., Thierfelder, W.E., Kreider, B.L., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., 1994. Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Molecular and cellular biology* 14, 4342-4349.
- Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., Kishimoto, T., 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241, 825-828.
- Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, J.M., Kotani, K., Quadro, L., Kahn, B.B., 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436, 356-362.
- Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J.N., Yoshimura, A., 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO journal* 18, 1309-1320.
- Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T., Nakai, S., Kishimoto, T., 1987. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *The EMBO journal* 6, 2939-2945.
- Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T., Kishimoto, T., 1993. Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *The EMBO journal* 12, 1705-1712.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., Newgard, C.B., Spiegelman, B.M., 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131-138.
- Yu, B.L., Zhao, S.P., Hu, J.R., 2010. Cholesterol imbalance in adipocytes: a possible mechanism of adipocytes dysfunction in obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 11, 560-567.
- Zanjani, T.M., Sabetkasaei, M., Mosaffa, N., Manaheji, H., Labibi, F., Farokhi, B., 2006. Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *European journal of pharmacology* 538, 66-72.
- Zhang, P.L., Levy, A.M., Ben-Simchon, L., Haggiag, S., Chebath, J., Revel, M., 2007. Induction of neuronal and myelin-related gene expression by IL-6-receptor/IL-6: a study on embryonic dorsal root ganglia cells and isolated Schwann cells. *Experimental neurology* 208, 285-296.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhong, J., Dietzel, I.D., Wahle, P., Kopf, M., Heumann, R., 1999. Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the*

Bibliografia

official journal of the Society for Neuroscience 19, 4305-4313.

Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr., 1994. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 4806-4810.

Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J.H., Revel, M., 1986. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. The EMBO journal 5, 2529-2537.

Zorrilla, E.P., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., Brennan, M., Fernandez, R., Bartfai, T., Conti, B., 2007. Interleukin-18 controls energy homeostasis by suppressing appetite and feed efficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 11097-11102.

