

Departament de Nutrició i Bromatologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

**MODULACIÓ FARMACOLÒGICA DE L'OLEOÏL-
ESTRONA SOBRE LA INGESTA I LA
COMPOSICIÓ CORPORAL**

RAQUEL FERRER LORENTE
Barcelona, Novembre de 2007

MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA
PROGRAMA DE DOCTORAT DE NUTRICIÓ I METABOLISME, BIENNI 2002-2004
DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Presentada per

RAQUEL FERRER LORENTE

Vist i plau dels directors

Dr. Marià Alemany

Dra. Cristina Cabot

Departament de Nutrició i Bromatologia
Universitat de Barcelona

La interessada

Raquel Ferrer Lorente

Per un somni fet realitat...

Arribat aquest punt... quin cúmulo de sentiments... que difícil expressar tot el que sento... quants intents per escriure... per plasmar en paraules l'agraïment a tot el suport que he rebut... que curtes es queden les paraules... Quantes llàgrimes... d'alegria... d'emoció... de nostàlgia... d'enyorança per tot el viscut... i d'il·lusió pel que vindrà. Descans, nerviosisme, un nus en la gola, els ulls vidriosos,... però sobre tot agraïment!!!

Gràcies per tots els consells, per tot el que m'heu ensenyat, per compartir amb mi el dia a dia, i moments tants importants de la meua vida... Gràcies pel vostre somriure, abraçades i ànims quan més ho necessitava...Gràcies per fer possible aquest somni...

Marià, el meu pilar científic, gràcies per confiar en mi, per fer-me participar d'aquest gran projecte, pels teus consells... de la vida... científics... i com no culinàries, per estar sempre que ho necessitava, per les llargues converses... gràcies per donar-me l'oportunitat de fer realitat aquest somni.

Cris, l'altre gran pilar, gràcies pel teu recolzament, per lluitar al meu costat i no deixar-me llençar la tovallola. Les hem vist de tots colors... però ho hem aconseguit!!! Gràcies per ensenyar-me, per la teua paciència i per compartir amb mi grans moments de la meua vida. Vals molt i t'ho has de creure!!!

Que dir del Xavier... una de les millors persones que he conegut... Amb ell, la Bea i la Susana vaig donar els meus primers passos científics... un gran cor i un gran amic.

Jose, gracias a ti tuve la suerte de conocer este gran proyecto...a ti te debo mi incorporación al grupo... por lo que siempre te estaré enormemente agradecida. Muchas gracias!!!

I com no, gràcies a les més veteranes... Eh Montse... que ho dic per l'experiència!! Gràcies per la teua alegria, per aquest esperit tant jove, pel balls que de tant en tant ens has brindat al laboratori... i per descomptat... gràcies per compartir la teua experiència, pels teus consells... Mar... sempre disposada..., gràcies per les teves idees, per compartir la teua experiència, per tots els bons consells... pel flam de mató i compartir amb mi el secret de la seva elaboració. Per mi ets un exemple a seguir... un petonarro!!! Gràcies Ruth, per estar sempre al meu costat, per tots els teus consells, pel teu recolzament incondicional, per la teua amistat i per totes les classes al Dir que hem compartit... preparat que tornaré i amb forces!!!

Mercè, gràcies per compartir el teu somriure amb mi cada matí... pels esmorzars que tant trobaré a faltar... per escoltar-me...

Anna, qui m'hagués dit aquell primer dia de classe en biologia que compartiríem tantes coses? Gràcies per compartir la teua experiència, pels teus consells, per escoltar-me en tantes ocasions... i sobre tot moltíssimes gràcies per la teua amistat!!!

Moltíssimes gràcies a les futures doctores, a les meves companyes inseparables en aquesta aventura... el camí no ha estat fàcil... però ho hem aconseguit!!! Hem compartit tantes coses...

alegries, llàgrimes, mirades de complicitat, nervis sobre tot en aquesta etapa final... rialles... mira que hem rigut plegades... i les que espero que quedin per compartir... Mar, la calma y la serenidad, una gran compañera y sobretodo una gran amiga... gracias por estar todos estos años a mi lado. Marta, per mi una de les persones més especials... la meva companya de taula en els sopars... la meva amiga... tenim tantes coses pendents... receptes (tu brownie i jo tiramisú)... una foto, ... Moltes gràcies per tot, per estar sempre al meu costat... per deixar-me conèixer a la verdadera Marta. Bea, el nerviosismo y la explosión, la más especial... mi apoyo en tantas ocasiones, el hombro en el que llorar y la compañera con la que reír. Contigo empecé esta aventura, he compartido tantas cosas... y las que espero poder compartir. Gracias por estar siempre ahí. Us trobaré tant a faltar...

Moltes gràcies a tots amb els que he compartit grans moments al laboratori, Maite, que em va acollir en els meus inicis, David, Gemma, Joan, Mac, Marta D, Paulina, Ricard, Susana i sobre tot a l'Ana... gràcies pel teu recolzament en la distància des de la "Bella Italia".

Gràcies a tota la gent de l'estabulari, a la Carmen de radioisòtops i a la gent de genòmica i reconeixement molecular del Parc Científic per ajudar-me en la meva feina... Gràcies a tots aquells amb els que he compartit encara que sigui per un instant la meva vida al departament de Bioquímica... els de Càncer, LPL, Insulina... i totes les cares conegudes que quan torno a trobar-les em fan sentir com a casa. Gràcies Gemma, per compartir amb mi tantes coses, per escoltar-me, i sobre tot....molts ànims en la recta final!!!

La vostra amistat, els moments viscuts... són el millor resultat que m'emporto. Os trobaré a faltar moltíssim!!!

Gràcies als meus nous companys de l'ICCC... Carlota, Javi, Judith, Mari, Mónica, Olaya, Pablo, Patri, Rodrigo, Sònia, Xevi... pel vostre recolzament en aquests estressants últims mesos, per la vostra alegria i per animar-me quan més ho necessitava. Gràcies, Gemma i Lina... per un futur, per donar-me l'oportunitat de continuar investigant, de treballar en el que més m'agrada, de seguir somiant...

Gràcies als meus amics de la uni, David, Josep, Marta, Naty, Òscar, Roser i Toni amb els que vaig iniciar aquesta gran aventura biològica i he compartit tantes coses. Gràcies pel vostre interès, pels vostres ànims... Òscar, tu ets el proper... calma, tranquil·litat i molta sort en aquesta nova etapa a Montreal...i sobre tot no t'oblidis de Barcelona ni dels que t'estarem aquí esperant. Josep... ara et toca a tu... has de continuar, perquè prenent paraules d'un gran filòsof.. "encara que les arrels són amargants els fruits acaben sent molt dolços".

Gràcies a tots els de la colla, Alberto, Analía, Edu, Isa, Jaira, Jordi, Luis, Manolo, Mari, Maribel, Naty, Oliver, Ramón, Ricard, Sònia... pel vostre interès, per rescatar-me en els moments de crisi i fer-me desconnectar en els moments que més ho necessitava.

I en especial, gràcies a la meva família... gracias papa y mama por darme todo, la vida, el cariño, el apoyo incondicional, por vuestra paciencia, por todos los consejos, por vuestro ejemplo, por ser el espejo en el que reflejarme. Gracias Aitor por tu cariño... por hacerme reír en mis peores momentos. Y a ti Francis, me faltan palabras para expresar todo mi agradecimiento... gracias sobre todo por tu paciencia infinita, por aguantar mi mal humor y mis rollos, por apreciar mi trabajo y darme fuerzas para seguir adelante. Gracias por estar siempre ahí..., por tu amistad, por tu cariño, por un beso, por un abrazo.... cuando más lo necesitaba.

... a tots, gràcies.

ABREVIATURES

| | |
|------------------|---|
| ACC | Acetil-Coa carboxilasa |
| ACE | Enzim conversor de l'angiotensina |
| ACOD | Acil-CoA oxidasa |
| ACS | Acil-CoA sintetasa |
| ACTH | Hormona adrenocorticotropina |
| ADNc | Àcid desoxiribonucleic complementari |
| AgRP | Pèptid relacionat amb <i>agouti</i> |
| α -MSH | Hormona estimuladora dels melanòcits α |
| AP | Àrea postrema |
| Apo A-IV | Apolipoproteïna A-IV |
| Apo E | Apolipoproteïna E |
| AR | Receptors adrenèrgics |
| ARBP | <i>Acidic Ribosomic Binding Protein</i> |
| ARC | Nucli arquejat |
| ARNm | Àcid ribonucleic missatger |
| ATP | Trifosfat d'adenosina |
| β_1 AR | Receptors adrenèrgics β_1 |
| β_2 AR | Receptors adrenèrgics β_2 |
| β_3 AR | Receptors adrenèrgics β_3 |
| β -HBDH | β -hidroxibutirat deshidrogenasa |
| 11 β -HSD1 | 11 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa de tipus 1 |
| CART | Trànscrip regulat per cocaïna i amfetamina |
| CB | Cannabinoids |
| CBG | Globulina lligadora de corticosteroides |
| CCK | Coleocistoquinina |
| C/EBP α | Proteïna d'unió a l'element estimulador CCAAT α |
| C/EBP β | Proteïna d'unió a l'element estimulador CCAAT β |
| CNTF | Factor neurotròfic ciliar |
| CoA | Coenzim A |
| CPT1b | Carnitina palmitoil-transferasa 1b |
| CRH | Hormona alliberadora de corticotropina |
| DMH | Hipotàlem dorsomedial |
| ER α | Receptor d'estrògens α |
| ER β | Receptor d'estrògens β |
| F | Fòrnix |
| FABP4 | Proteïna lligadora d'àcids grassos |
| FAS | Àcid gras sintasa |
| FATP1 | Proteïna transportadora d'àcids grassos |

| | |
|---------------|--|
| FDA | <i>Food and drug administration</i> |
| GAL | Galanina |
| GH | Hormona del creixement |
| GIP | Polipèptid insulinoatròpic dependent de glucosa |
| GLP-1 | Pèptid anàleg al glucagó 1 |
| GLP-2 | Pèptid anàleg al glucagó 2 |
| GPDH | Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa |
| GRP | Pèptid alliberador de la gastrina |
| HDL | Lipoproteïna d'alta densitat |
| HPA | eix hipotàlem-hipòfisi-adrenal |
| 5-HT | Serotonina |
| ICV | Intracerebroventricular |
| IDF | <i>International Diabetes Federation</i> |
| IFC | Índex de forma corporal o índex de Rohrer |
| IL-6 | Interleuquina 6 |
| IMC | Índex de massa corporal o índex de Quetelet |
| IRS-1 | <i>Insulin receptor substrate 1</i> |
| LDL | Lipoproteïna de baixa densitat |
| LHA | Hipotàlem lateral |
| LPL | Lipoproteïna lipasa |
| MAO | Monoamino oxidasa |
| MCH | Hormona concentradora de melanina |
| MC3 | Receptor de les melanocortines 3 |
| MC4 | Receptor de les melanocortines 4 |
| ME | Eminència mitja |
| NA | Noradrenalina |
| NCEP-ATP III | <i>National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III</i> |
| NGF | Factor de creixement nerviós |
| NPY | Neuropèptid Y |
| NTS | Nucli del tracte solitari |
| OE | Oleoïl-estrona |
| OEA | Oleoiletanolamida |
| PAI-1 | Inhibidor de l'activador del plasminògen 1 |
| PCR | Reacció en cadena de la polimerasa |
| PDE 3B | Fosfodiesterasa 3B |
| POMC | Proopiomelanocortina |
| PP | Polipèptid pancreàtic |
| PPAR α | Receptor activat de proliferació peroxisomal α |

| | |
|---------------|---|
| PPAR β | Receptor activat de proliferació peroxisomal β |
| PPAR γ | Receptor activat de proliferació peroxisomal γ |
| PTP1B | Proteïna tirosina fosfatasa-1B |
| PVN | Nucli paraventricular |
| PYY | Pèptid YY |
| RBP | Proteïna lligadora de retinol |
| RIA | Radioimmunoassaig |
| SNC | Sistema nerviós central |
| SOCS3 | Supressor de la senyalització de citoquines 3 |
| SREBP1c | <i>Sterol regulatory element binding factor 1c</i> |
| TAB | Teixit adipós blanc |
| TAM | Teixit adipós marró |
| TNF α | Factor de necrosi tumoral α |
| TR α | Receptor d'hormones tiroïdals α |
| TR β | Receptor d'hormones tiroïdals β |
| TRH | Hormona alliberadora de tirotropina |
| TSH | Tirotropina o hormona estimuladora de la tiroïdes |
| TZD | Tiazolidinadiones |
| UCP | Proteïna desacobladora |
| VEGF | Factor de creixement endotelial vascular |
| VLDL | Lipoproteïnes de molt baixa densitat |
| VMH | Hipotàlem ventromedial |

ÍNDEX

| | |
|---|----------|
| I. INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1. CONTROL DEL PES CORPORAL | 1 |
| 1.1. Mecanismes de control de la ingesta | 2 |
| 1.1.1. Mecanismes de control gastrointestinal de la ingesta | 4 |
| 1.1.1.1. Senyals de sadollament | 4 |
| 1.1.1.1.1. Senyals gàstrics de sadollament | 4 |
| 1.1.1.1.2. Senyals intestinals i pancreàtics de sadollament | 5 |
| 1.1.1.2. Ghrelina, únic senyal gastrointestinal orexigènic | 10 |
| 1.1.2. Mecanismes de control del sistema nerviós central sobre la ingesta | 12 |
| 1.1.2.1. L'hipotàlem, principal centre regulador de la ingesta | 12 |
| 1.1.2.2. El complex vagal dorsal | 13 |
| 1.1.2.3. Neuropèptids implicats en el control hipotalàmic de la ingesta | 14 |
| 1.1.2.3.1. Neuropèptids orexigènics | 14 |
| 1.1.2.3.2. Neuropèptids anorexigènics | 17 |
| 1.1.2.4. Neurotransmissors implicats en el control de la ingestió d'aliment | 20 |
| 1.2. Mecanismes de control de la despesa energètica | 23 |
| 1.2.1. Termogènesi al múscul esquelètic | 24 |
| 1.2.2. Termogènesi al teixit adipós marró | 24 |
| 1.2.3. Mecanismes de control de la termogènesi | 26 |
| 1.3. Mecanismes de control exercits pel teixit adipós blanc | 26 |
| 1.3.1. Leptina | 28 |
| 1.3.2. Adiponectina | 31 |
| 1.3.3. Factor de necrosi tumoral | 32 |
| 1.3.4. Interleuquina 6 | 33 |
| 1.3.5. Resistina | 33 |
| 1.3.6. Visfatina | 34 |
| 1.4. Altres mecanismes de control del pes corporal | 34 |
| 1.4.1. Insulina | 35 |
| 1.4.2. Hormones tiroïdals | 36 |
| 1.4.3. Hormones esteroïdals | 36 |
| 2. OBESITAT I SÍNDROME METABÒLICA | 39 |
| 2.1. L'obesitat | 39 |
| 2.1.1. Etiologia de l'obesitat | 40 |
| 2.1.2. Tractament de l'obesitat | 42 |
| 2.1.2.1. Fàrmacs que actuen sobre la disponibilitat energètica | 44 |
| 2.1.2.1.1. Fàrmacs que modifiquen la ingestió d'aliment | 44 |
| 2.1.2.1.1.1. Agents adrenèrgics | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1.2.1.1.2. Agents serotoninèrgics | 45 |
| 2.1.2.1.1.3. Agents d'acció combinada: adrenèrgics i serotoninèrgics | 47 |
| 2.1.2.1.1.4. Antagonistes del receptor de cannabinoides | 48 |
| 2.1.2.1.1.5. Pèptids hipotàlamics | 49 |
| 2.1.2.1.1.6. Pèptids gastrointestinals | 50 |
| 2.1.2.1.1.7. Altres agents modificadors de la ingestió d'aliment | 52 |
| 2.1.2.1.2. Agents que modifiquen la disponibilitat i absorció de nutrients | 55 |
| 2.1.2.1.2.1. Substitutius hipocalòrics | 55 |
| 2.1.2.1.2.2. Fàrmacs que modifiquen l'absorció de nutrients | 55 |
| 2.1.2.2. Fàrmacs termogènics | 57 |
| 2.1.2.2.1. Fàrmacs adrenèrgics | 57 |
| 2.1.2.2.2. Hormones tiroïdals | 59 |
| 2.1.2.3. Altres aproximacions farmacològiques | 59 |
| 2.1.2.3.1. Anàlegs de l'hormona de creixement | 59 |
| 2.1.2.3.2. Agents moduladors del metabolisme lipídic | 60 |
| 2.1.2.3.3. Hormones esteroidals | 61 |
| 2.2. La síndrome metabòlica | 62 |
| 2.2.1. Patofisiologia de la síndrome metabòlica | 64 |
| 2.2.2. Tractament de la síndrome metabòlica | 65 |
| 2.2.2.1. Fàrmacs antidiabètics | 66 |
| 2.2.2.2. Tractament dels factors de risc associats a la síndrome metabòlica | 69 |
| 3. OLEOÏL-ESTRONA | 71 |
| 3.1. L'oleïl-estrona, senyal de regulació del pes corporal | 71 |
| 3.1.1. Estructura de l'OE | 72 |
| 3.2. Efectes de l'OE | 73 |
| 3.2.1. Efectes sobre el pes corporal i el metabolisme energètic | 73 |
| 3.2.2. Efectes sobre els paràmetres plasmàtics | 75 |
| 3.2.3. Efectes sobre el teixit adipós blanc | 77 |
| 3.3. Distribució i nivells d'OE | 78 |
| 3.4. Mecanisme d'acció de l'OE | 80 |
| II. OBJECTIUS | 85 |
| III. MATERIALS I MÈTODES | 91 |
| 1. ANIMALS I CONDICIONS D'ESTABULACIÓ | 91 |
| 2. DISSENYS EXPERIMENTALS | 91 |
| 2.1. Estudi dels efectes de l'administració oral d'estrona sobre el balanç energètic | 91 |
| 2.1.1. Preparació de les dosis d'estrona | 92 |

| | |
|---|-----|
| 2.1.2. Sacrifici i obtenció de les mostres | 92 |
| 2.2. Estudi dels efectes del tractament combinat de l'OE amb el tamoxifè | 92 |
| 2.2.1. Preparació de les dosis d'OE, tamoxifè i estrona | 93 |
| 2.2.2. Sacrifici i obtenció de les mostres | 94 |
| 2.3. Estudi dels efectes del tractament combinat de l'OE amb altres agents aprimadors | 94 |
| 2.3.1. Composició de la dieta de cafeteria | 96 |
| 2.3.2. Preparació de les dosis | 96 |
| 2.3.3. Sacrifici i obtenció de les mostres | 97 |
| 2.4. Estudi dels efectes del tractament combinat de l'OE amb la rosiglitazona | 98 |
| 2.4.1. Preparació de les dosis | 99 |
| 2.4.2. Sacrifici i obtenció de les mostres | 99 |
| 2.5. Estudi dels efectes del tractament d'OE sobre l'expressió dels principals pèptids moduladors de la ingesta a curt termini | 101 |
| 2.5.1. Preparació de les dosis | 101 |
| 2.5.2. Sacrifici i obtenció de les mostres | 102 |
| 3. VALORACIONS SÈRIQUES | 102 |
| 3.1. Metabòlits plasmàtics | 102 |
| 3.1.1. Glucosa | 102 |
| 3.1.2. Àcids grassos lliures | 102 |
| 3.1.3. Triacilglicerols | 103 |
| 3.1.4. Colesterol total | 103 |
| 3.1.5. Colesterol HDL | 104 |
| 3.1.6. β -hidroxibutirat | 104 |
| 3.1.7. Proteïnes | 104 |
| 3.1.8. Urea | 104 |
| 3.1.9. Creatinina | 105 |
| 3.1.10. Transaminases | 105 |
| 3.2. Hormones | 106 |
| 3.2.1. Insulina | 106 |
| 3.2.2. Leptina | 106 |
| 3.2.3. Adiponectina | 107 |
| 3.2.4. Estrona lliure | 107 |
| 3.2.5. Estradiol | 107 |
| 3.2.6. Oleoïl-estrona | 108 |
| 3.3. Pèptids gastrointestinals | 109 |
| 3.3.1. Ghrelina | 109 |
| 3.3.2. CCK | 109 |
| 3.3.3. GLP-1 | 110 |

| | |
|---|------------|
| 4. VALORACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DE L'HOMOGENAT | 110 |
| 4.1. Lípids totals | 110 |
| 4.2. Aigua total | 111 |
| 4.3. Proteïnes | 111 |
| 4.4. Energia emmagatzemada | 113 |
| 5. DETERMINACIÓ DE LA CEL·LULARITAT I DE LA MASSA CEL·LULAR | 114 |
| 5.1. Valoració de l'ADN | 114 |
| 6. ESTUDI DE L'EXPRESSION GÈNICA | 116 |
| 6.1. Extracció de l'ARN dels teixits | 116 |
| 6.2. Quantificació de l'ARN | 118 |
| 6.3. Comprovació de la integritat de l'ARN | 119 |
| 6.3.1. Electroforesi en gel d'agarosa | 119 |
| 6.4. RT-PCR | 120 |
| 6.5. Disseny d'encebadors | 121 |
| 6.6. PCR a temps real | 124 |
| 7. ANÀLISI ESTADÍSTIC | 126 |
| IV. RESULTATS | 129 |
| 1. Effect of oral estrone on rat energy balance | 129 |
| 2. Tamoxifen does not prevent the mobilization of body lipids elicited by oleoyl-estrone | 137 |
| 3. Effects of oleoyl-estrone with dexfenfluramne, sibutramine or phentermine on overweight rats | 145 |
| 4. Combined effects of oleoyl-estrone and a β_3 -adrenergic agonist (CL316,243) on lipid stores of diet-induced overweight male Wistar rats | 153 |
| 5. Effects of combined oleoyl-estrone and rimonabant on overweight rats | 163 |
| 6. Site-specific modulation of white adipose tissue response to oral oleoyl-estrone and/or rosiglitazone in overweight male rats | 173 |
| 7. Short-term oral oleoyl-estrone decreases the expression of ghrelin in the rat stomach | 195 |
| V. DISCUSSIÓ GENERAL | 213 |
| VI. CONCLUSIONS | 227 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 231 |

I. INTRODUCCIÓ

1. CONTROL DEL PES CORPORAL

El manteniment del pes corporal i del nivell de reserves adequat per a la supervivència, és en essència un sistema homeostàtic (Kennedy, 1953; King, 1976) controlat mitjançant la complexa coordinació de diferents sistemes que incideixen sobre l'equilibri energètic i que responen a senyals de procedència diversa. La idea que la massa de greix depèn pràcticament sols de la disponibilitat d'energia ingerida ja no és sostenible a la llum dels coneixements actuals; prova d'això és la dificultat extrema per modificar la massa corporal que experimenten moltes persones amb pesos elevats o molt baixos, a les quals els seus sistemes de control no els permeten aconseguir un pes més pròxim als valors considerats dins la normalitat malgrat els seus esforços (Dulloo et al., 2004; Major et al., 2007; Westerterp-Plantenga et al., 1998).

En el control de les reserves corporals coexisteixen mecanismes neuronals, hormonals i metabòlics que influeixen activament sobre els processos que regulen el control del pes corporal, determinats per una base genètica (Cummings i Schwartz, 2003) i uns patrons de desenvolupament específics per a cada moment del cicle vital (Ravelli et al., 1976). El cervell és l'encarregat d'ajustar el pes corporal als diferents moments del cicle vital (desenvolupament, pubertat, plenitud funcional, senectut) i a situacions fisiològiques (gestació, alletament) o alteracions funcionals (malaltia, dejuni) intentant en tot moment mantenir l'homeòstasi energètica que permeti la supervivència amb el mínim consum de reserves (Levin i Routh, 1996).

S'han proposat diversos models homeostàtics per explicar la complexitat dels mecanismes de regulació del pes corporal, tots ells basats en l'existència d'un sistema controlador central localitzat a l'hipotàlem, que integra i tradueix la informació enviada des de la perifèria, tot modulant la ingesta o despesa energètica per tal de corregir possibles desviacions del pes corporal prefixat (Harris, 1990). Kennedy va ser el primer en proposar el seu model lipostàtic en el qual postula de l'existència d'un senyal, ponderostat o lipostat, sintetitzat i alliberat en proporció a la massa grassa, que informaria als centres de control del pes corporal del cervell de la quantitat de reserves grasses que té l'organisme per tal de mantenir-ne l'homeòstasi energètica (Kennedy, 1953). Hervey, posteriorment va proposar que aquest factor de sadollament circulant podria ser un agent de naturalesa lipídica com els esteroides (Hervey, 1969), alhora que Mayer proposava el seu model glucostàtic i a la glucosa com a candidat (Mayer, 1953).

El control de la ingestió d'aliment i de la despesa energètica són els dos factors principals que determinen el balanç energètic i per tant el pes corporal de l'organisme (Spiegelman i Flier, 2001). Clàssicament el balanç energètic es planteja amb l'equació:

$$\text{RESERVES} = \text{ENERGIA INGERIDA} - \text{DESPESA ENERGÈTICA}$$

Quan disminuïm la ingesta energètica es produeix una adaptació més o menys ràpida a la nova situació mitjançant una reducció paral·lela de la despesa energètica (Leibel et al., 1995), el que fa que l'impacte de la reducció de la ingesta sobre les reserves no sigui tant marcada. Per contra la realimentació ens duu a un nou nivell més elevat de despesa energètica (Dulloo i Calokatisa, 1991). De la mateixa manera, un fort increment de la despesa energètica compensarà la situació amb un increment de la gana, incrementant així la disponibilitat energètica (Blundell i King, 1998) i preservant les reserves.

En situació de normalitat, per tant, el balanç energètic es manté equilibrat oscil·lant sense que es produeixin grans variacions. Però no sempre aquestes variacions són corregides. Quan la ingesta energètica és més gran que el consum energètic es genera un balanç positiu que promourà la deposició de reserves grasses i un increment del pes corporal. Quan, pel contrari, el consum energètic és més gran que la ingesta, el balanç energètic serà negatiu, induint una disminució dels dipòsits adiposos i una reducció del pes. Si aquestes alteracions del balanç energètic són sostingudes durant llargs períodes de temps poden donar lloc a patologies associades a un nivell de reserves i un pes corporal fora de la normalitat: obesitat si el balanç es manté positiu o baix pes quan el balanç es manté negatiu.

Els principals sistemes que modulen el control de la massa d'energia emmagatzemada i per tant, el pes corporal són essencialment tres: control de la ingesta, que modularà a grans trets la disponibilitat energètica, control de la despesa energètica, que permetrà una modulació més fina de la disponibilitat d'energia eliminant l'energia sobrant i per últim, el control exercit pel propi dipòsit de reserves.

1.1. MECANISMES DE CONTROL DE LA INGESTA

La ingestió d'aliment respon a la necessitat fisiològica de proporcionar nutrients a l'organisme per preservar la vida i l'espècie. El factor clau per iniciar el consum d'aliment és la sensació de gana (Blundell, 1991). Aquesta sensació és activada principalment en resposta a factors fisiològics que informen al cervell respecte les reserves de nutrients, com ara l'hipoglucèmia, que posarà en marxa tota una sèrie de mecanismes reguladors destinats a contrarestar la situació. Però la sensació de gana no només respon a factors fisiològics, l'inici d'un àpat pot respondre a factors ambientals de caràcter sensorial, com ara la visualització d'un aliment atractiu, o de caràcter social, com un ambient agradable o una bona companyia (Powley, 1977).

Si la ingestió d'aliment es demora, s'indueix una sensació de gana, la qual ja no és una sensació d'apetència selectiva, sinó una sensació de necessitat energètica d'ingerir un aliment (Friedman i Stricker, 1976). Aquesta sensació apareix de manera progressiva incrementant la seva intensitat fins a aconseguir l'aliment desitjat. La ingestió d'aquest aliment farà disminuir la

sensació de gana i incrementarà progressivament la sensació de sadollament que frenarà la ingestió d'aliment de més aliment i determinarà la mida de l'àpat. (Forbes, 1992).

Així, el control de la ingestió és un procés altament complex en el qual estímuls aferents diversa son integrats al cervell, establint un equilibri entre gana i sadollament que modularà el balanç energètic i, en definitiva, el pes corporal. Aquests estímuls en una primera classificació molt simplista els podem diferenciar en aquells que realitzen un control de la ingestió d'aliment a curt termini, que principalment es durà a terme per senyals físiques (distensió gàstrica) i per l'alliberament de pèptids gastrointestinals; i un control a mitjà o llarg termini, basat en senyals d'adipositat (oleoil-estrona, leptina i insulina) que indiquen els nivells de reserves grasses de l'organisme (Morton et al., 2006).

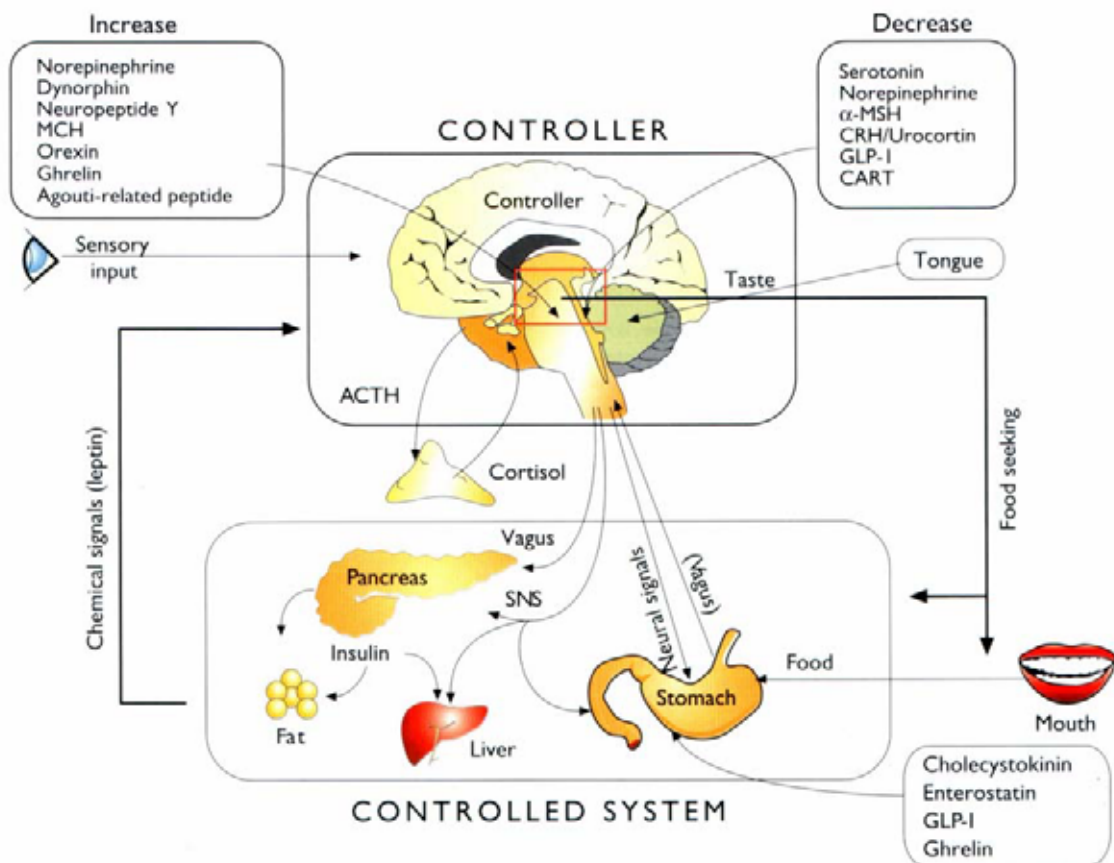


Figura 1. Esquema general del mecanisme de control de la ingestió d'aliment. El sistema de regulació disposa d'un controlador (hipotàlem) que rep senyals sensorials, senyals químiques o hormonals (leptina i insulina) i pèptids intestinals o neuropèptids que incrementen/disminueixen la ingestió d'aliment en relació a l'estat metabòlic del sistema controlat (teixit adipós blanc, fetge, pàncrees i estómac). Els òrgans del sistema controlat reben també ordres del controlador i responen augmentant/disminuint el metabolisme. La ingestió d'aliment intervé també en la regulació mitjançant els efectes dels senyals sobre l'absorció i la motilitat gastrointestinal (Bray, An Atlas of obesity and weight control. The Parthenon Publishing Group, USA, 2003).

| Agents Orexigènics | Agents Anorexigènics |
|--|--|
| Endocannabinoids | Hormona alliberadora de corticotropina (CRH) Melanocortines (POMC, α -MSH) |
| Galanina | Neurotensina |
| Hormona concentradora de melanina (MCH) | Trànscrip regulat per cocaïna i amfetamina (CART) |
| Neuropèptid Y (NPY) | |
| Orexines | Dopamina |
| Pèptid relacionat amb <i>agouti</i> (AgRP) | Histamina |
| | Noradrenalina |
| Ghrelina | Serotonina |
| | Amilina |
| | Apolipoproteïna A-IV (Apo A-IV) |
| | Coleocistoquinina (CCK) |
| | Enterostatina |
| | Oxintomodulina |
| | Pèptids anàlegs al glucagó (GLP-1, GLP-2) |
| | Pèptids relacionats amb la bombesina |
| | Pèptid YY (PYY) |
| | Polipèptid pancreàtic (PP) |
| | Insulina |
| | Leptina |
| | Oleoïl-estrona (OE) |

Taula 1. Principals reguladors de la ingesta.

1.1.1. MECANISMES DE CONTROL GASTROINTESTINAL DE LA INGESTA

El sistema gastrointestinal té un paper clau en el control de l'energia ingerida a curt termini determinant l'inici i final de cada àpat. Des de diverses localitzacions del sistema gastrointestinal són enviats senyals de naturalesa mecànica o química que modulen directament les sensacions de gana i sadollament.

1.1.1.1. SENYALS DE SADOLLAMENT

En resposta a la ingestió d'aliment es produeix una distensió gàstrica i l'alliberament de pèptids de les cèl·lules enteroendocrines, primers senyals de inducció de sadollament a curt termini (Cummings i Overduin, 2007). Aquests senyals seran transmesos al sistema nerviós central (SNC) via neuronal (aferències vagals projectades al nucli del tracte solitari (NTS)) o hormonal, per actuació directa dels propis pèptids a l'àrea postrema (AP); aquí seran integrats modulant-ne l'activitat dels sistemes neuronals efectors que controlen ingesta i el consum energètic (Schwartz et al., 2000).

1.1.1.1.1. SENYALS GÀSTRICS DE SADOLLAMENT

L'estómac, densament innervat, promou el sadollament principalment com resposta a un estímul mecànic de distensió captat pels mecanoreceptors i transmès via vagal i espinal al SNC (Powley i Phillips, 2004). Així, la càrrega gàstrica limita la ingestió d'aliment en relació al seu volum, més que en funció del seu contingut de nutrients, osmolaritat o pH (Phillips i Powley, 1996).

A més de la inducció mecànica de sadollament, també s'ha vist una producció de pèptids específics en resposta a la presència d'aliment en les neurones mientèriques de l'estómac.

Pèptids relacionats amb la bombesina

Els pèptids relacionats amb la bombesina, com el pèptid alliberador de gastrina i les neuromedines B i C, són anomenats així per la seva similitud estructural amb la bombesina, un pèptid aïllat per primera vegada de la pell dels amfibis (Lee et al., 1994). Encara són pocs els coneixements que es tenen dels mecanismes d'actuació d'aquests pèptids. L'administració perifèrica de bombesina redueix la ingesta en humans primis, efecte que no es observat en individus obesos (Lieverse et al., 1994). El pèptid alliberador de gastrina indueix sadollament tant en rosegadors com en humans (Gutzwiller et al., 1994; Stein i Woods, 1982), possiblement per la presència de receptors específics al cervell (Ladenheim et al., 1996).

1.1.1.1.2. SENYALS INTESTINALS I PANCREÀTICS DE SADOLLAMENT

Les cèl·lules enteroendocrines responen amb una variada secreció de pèptids mediadors del sadollament davant de l'arribada de l'aliment en procés de digestió. Aquests mediadors intestinals, a diferència dels gàstrics, responen a un estímul més químic que mecànic (Powley i Phillips, 2004). Aquests senyals es difonen a través de la làmina pròpia activant fibres nervioses vagals, espinals o entèriques, o bé són alliberats a la sang actuant llavors com a veritables hormones.

Coleocistoquinina

La coleocistoquinina (CCK) va ser el primer pèptid intestinal inductor del sadollament descrit ara fa tres dècades (Gibbs et al., 1973). Anteriorment, al 1928, ja havia estat descoberta com hormona que produïa contracció de la vesícula biliar (Ivy i Oldberg, 1928). És produïda per les cèl·lules de la mucosa del duodè i jejú, i es secretada com a resposta de la presència de nutrients, especialment lípids i proteïnes, a la llum intestinal (Scharf i Ahima, 2004).

La CCK és sintetitzada com a prepropèptid, que és processat donant lloc a diferents formes de la CCK, que difereixen en el nombre d'aminoàcids que les formen, CCK-8, CCK-22, CCK-33 i CCK-58 essent les variants majoritàries (Rehfeld, 2004). Aquestes formes actuen a través de dos receptors, CCK_A o CCK₁ que predomina en el sistema gastrointestinal i està present al cervell (NTS i hipotàlem dorsomedial), i CCK_B o CCK₂ majoritari al cervell. Diversos experiments farmacològics i genètics semblen indicar que els receptors CCK₁ són els que tenen un paper més important en el control de la ingesta en la majoria de les espècies estudiades (Asin et al., 1992).

Els efectes sadollants centrals de la CCK han estat confirmats repetides vegades: l'abolició dels efectes de la CCK per vagotomia confirma la inducció del sadollament indirecte mediat pels receptors CCK₁ situats en les aferències vagals (Smith et al., 1981), la microinjecció directa als

nuclis hipotalàmics de CCK disminueix la ingesta (Blevins et al., 2000), i lesions en l'àrea postrema del complex vagal dorsal atenuen els seus efectes (Edwards et al., 1986), el que demostra una inducció directa a través dels receptors situats en aquestes zones.

La CCK també actua localment facilitant l'absorció de nutrients, estimulant la contracció de la vesícula biliar, estimulant la secreció d'enzims pancreàtics i inhibint el buidat gàstric (Liddle et al., 1985; Moran i McHugh, 1982). Aquest últim efecte es presenta com un mecanisme addicional de reducció de la ingesta per part de la CCK, ja que la inhibició del buidat gàstric incrementarà la distensió gàstrica que induirà l'estimulació dels mecanoreceptors i per tant els senyals inductors de sadollament.

En rosegadors, s'ha observat que l'administració central de leptina i insulina augmenta la sensibilitat perifèrica a la CCK, el que suggereix l'existència d'un cert sinergisme entre la CCK i la leptina o la insulina en la regulació de la gana i de la ingestió (Matson et al., 1997; Riedy et al., 1995).

Quan s'administra CCK perifèricament abans de menjar, disminueix tant la mida com la durada de l'àpat de manera dosi-depenent (Gibbs et al., 1973); efectes que no s'observen si l'administració es fa més de 30 minuts abans de menjar. Aquests experiments confirmen la seva ràpida actuació però també la curta durada dels seus efectes, donat que la vida mitjana de la CCK és de tan sols 1-2 minuts. Si a la seva curta acció li afegim els resultats d'experiments en els que s'observa que el ratolí deficient en el receptor CCK₁ no presenta un fenotip d'obesitat (Kopin et al., 1999), podem concloure que la seva importància real en la regulació del pes corporal a llarg termini i el seu potencial com a diana antiobesitat resulten, com a mínim, qüestionables.

Pèptid anàleg al glucagó 1

El pèptid anàleg al glucagó 1 (GLP-1) és un producte derivat del proglucagó que s'expressa en les cèl·lules L de l'intestí prim distal i còlon, i en neurones del NTS que son projectades als nuclis arquejat, dorsomedial i paraventricular de l'hipotàlem. La seva secreció és estimulada tant indirectament per l'arribada dels nutrients ingerits al duodè, especialment lípids i glúcids, activant-ne mecanismes neurohormonals, com per contacte directe d'aquests nutrients amb la llum intestinal distal (Brubaker i Anini, 2003).

El GLP-1 indueix sadollament per inhibició de la motilitat gastrointestinal proximal i del buidat gàstric i per la supressió de les secrecions gàstriques i pancreàtiques (Wettergren et al., 1993). També s'ha observat que accentua l'alliberament d'insulina glucosa-depenent, inhibeix la secreció de glucagó i incrementa el creixement de les cèl·lules β pancreàtiques (Drucker, 2006), posant de manifest el seu potencial paper terapèutic pel tractament de la diabetis.

El GLP-1 disminueix la ingesta en diferents espècies, ja sigui administrat central- o perifèricament (Gutzwiller et al., 1999; Turton et al., 1996). L'administració crònica produeix

significatives pèrdues de pes en rosegadors (Meeran et al., 1999). Aquests efectes són mediatos a través del seu receptor, el GLP-1R, el qual és expressat en el mateix intestí, pàncrees, hipotàlem, tronc cerebral i aferències vagals (Drucker, 2006). Els efectes anorèctics del GLP-1 són absents en el ratolí deficient per al seu receptor, o es poden bloquejar antagonistes (Baggio et al., 2004). Els efectes anorèctics observats sota l'administració perifèrica de GLP-1 són dependents del nervi vagus, car són abolits per vagotomia (Abbott et al., 2005).

En individus obesos s'observa una menor secreció de GLP-1, que es recupera amb la pèrdua de pes (Verdich et al., 2001). Aquesta reducció en la secreció podria contribuir a la patogènesi de l'obesitat i a la seva persistència. Administracions subcutànies a individus obesos de GLP-1 durant 5 dies redueixen en un 15% l'energia ingerida, acompanyada d'una petita pèrdua de pes (Naslund et al., 2004). Tot i així, el seu potencial ús terapèutic està més encaminat vers el tractament de la diabetis, ja que promou sols petites pèrdues de pes, que no pas com a diana terapèutica contra l'obesitat.

Pèptid YY

El pèptid tirosina-tirosina o pèptid YY (PYY) és un membre de la família dels polipèptids pancreàtics, com el neuropèptid Y i el polipèptid pancreàtic, produït i alliberat per les cèl·lules L de la mucosa intestinal, amb elevades concentracions a l'íleon terminal i còlon i amb concentracions màximes al recte (Adrian et al., 1985). El PYY és segregat com a resposta a la ingestió d'aliment, especialment de dietes riques en greixos (Lin i Chey, 2003), acidesa gàstrica, CCK i sals biliars. De tota manera, l'alliberament del PYY es dona abans que els nutrients arribin a les cèl·lules del tracte distal, per tant la seva secreció ha de respondre més a un reflex neural que no solament al contacte directe amb els nutrients (Fu-Cheng et al., 1997).

A través de la unió als seus receptors, Y1, Y2, Y4, Y5 i Y6, el PYY inhibeix la secreció de fluids i electròlits a l'intestí prim, alenteix el transport intestinal dels nutrients i retarda el buidat de l'estómac i intestí gros (Neary i col, 2004). En humans, la infusió de PYY disminueix els nivells de ghrelina plasmàtica, el que també podria contribuir de manera indirecta a la disminució de la ingesta (Batterham et al., 2003).

Els efectes del PYY depenen de la via d'administració: així, l'administració perifèrica de PYY₃₋₃₆, forma activa del PYY, incrementa l'expressió de proopiomelanocortina (POMC) al nucli arquejat de l'hipotàlem causant una reducció de la ingesta i del pes corporal en rosegadors. En humans, la infusió intravenosa de PYY₃₋₃₆ redueix en un terç l'energia ingerida, reduint la ingesta i la gana sense produir nàusees ni alteració de la palatabilitat (Batterham et al., 2002). Contràriament a l'esperat, l'administració central de PYY incrementa la ingestió d'aliment (Hagan, 2002). Aquesta paradoxal actuació té una explicació basada en la zona hipotalàmica i subtipus de receptor implicats. Si l'administració intracerebroventricular no és específica, el PYY s'uneix als receptors Y1 i Y5 presents al nucli paraventricular, on s'incrementarà l'expressió del NPY incrementant la ingesta (Kanatani, 2000). En canvi, si l'administració és específica sobre el

nucli arquejat, el PYY reduirà la ingesta per inhibició de les neurones que expressen NPY i AgRP a través de la seva unió al receptor Y2. Sembla ser que el PYY₃₋₃₆ circulant té accés de manera selectiva als receptors Y2 del nucli arquejat, on, inhibeix les neurones NPY/AgRP, desbloquejant la inhibició que aquestes exerceixen sobre la producció de POMC. Així s'explicaria la reducció de la ingestió d'aliment observada en l'administració perifèrica (Batterham et al., 2002). Alguns investigadors atribueixen els efectes perifèrics anorèctics del PYY₃₋₃₆ a la presència de receptors Y2 en les terminals de les aferències vagals. Mitjançant vagotomia subdiafragmàtica els efectes anorèctics i l'activació neuronal a nivell de l'ARC produïda per l'administració perifèrica del PYY s'eliminen (Koda et al., 2005).

En individus obesos s'ha observat que els nivells del PYY estan disminuïts i que aquests responen reduint la ingesta en un 30% quan reben una infusió del PYY₃₋₃₆ (Batterham et al., 2003). En molts obesos s'ha vist que el que presenten és una resposta atenuada de l'alliberament del PYY davant del contingut calòric de la ingesta; necessiten consumir més energia per a assolir el mateix increment dels nivells del PYY que un individu amb normopes (Le Roux et al., 2006).

Oxintomodulina

L'oxintomodulina és un altre peptid derivat del proglucagó expressat en les cèl·lules L de les zones jejú-ileal de l'intestí, el pàncrees i el SNC. L'oxintomodulina és ràpidament alliberada en proporció a la energia ingerida i és particularment estimulada per la presència d'àcids grassos en la llum intestinal. Inhibeix el buidat i secreció gàstrica a través dels receptors del GLP-1 (Schjoldager et al., 1989), encara que no es descarta l'existència de receptors específics, ja que mostra una baixa afinitat envers els receptors del GLP-1 (Fehmann et al., 1994). Un altre mecanisme responsable de la regulació de la gana per part de l'oxintomodulina és la seva disminució dels nivells de ghrelina (Cohen et al., 2003), el que ha fet augmentar el seu interès terapèutic.

L'administració d'oxintomodulina disminueix la ingestió d'aliment incrementant la despesa energètica tant en rosegadors com en humans (Cohen et al., 2003; Dakin et al., 2001). En els dos models s'ha observat pèrdues de pes quan l'administració era continuada (Dakin et al., 2004; Wynne et al., 2006).

Peptid anàleg al glucagó 2

El peptid anàleg al glucagó 2 (GLP-2) és un altre membre de la família de peptids derivats del proglucagó expressat a nivell de les cèl·lules intestinals L i del SNC (Damholt et al., 1999). Greixos i glúcids són potents estimuladors de la seva secreció (Xiao et al., 1999). Igual que els altres peptids segregats per les cèl·lules L de l'intestí distal, el GLP-2 és segregat a la circulació d'una manera bifàsica en resposta a la ingestió de nutrients; el primer pic respon a un reflex

neuroendocrí d'origen vagal, mentre que el segon pic de secreció és el resultat de l'estimulació directa dels nutrients sobre les cèl·lules L (Dube i Brubaker, 2004).

El GLP-2 actua a través de receptors específics, àmpliament distribuïts per la perifèria i el SNC (Yusta et al., 2000). L'administració intracerebroventricular de GLP-2 en animals d'experimentació inhibeix la ingesta (Tang-Christensen et al., 2000), mentre que en rosegadors i humans l'administració perifèrica no sembla afectar la gana ni l'energia ingerida (Schmidt et al., 2003; Scott et al., 1998).

Polipèptid pancreàtic

El polipèptid pancreàtic (PP) és un altre membre de la família dels polipèptids pancreàtics produït sota control vagal per les cèl·lules endocrines F dels illots pancreàtics. La seva secreció postprandial és estimulada en proporció a la ingesta calòrica (Katsuura et al., 2002). A través dels receptors Y4 i Y5, el PP inhibeix la funció pancreàtica exocrina, modula la funció biliar i estimula la secreció gàstrica i la motilitat gastrointestinal (McTigue i Rogers, 1995).

El paper del PP en la homeòstasi energètica encara és tema de controvèrsia, ja que mentre la seva administració perifèrica disminueix la ingesta, la seva administració central la incrementa. Igual com succeeix amb l'administració del PYY₃₋₃₆, aquesta oposició d'efectes podria ser causada pels diferents receptors implicats. S'ha postulat que el PP circulant podria inhibir la ingestió d'aliment a través dels receptors Y4 de l'àrea postrema, mentre que el PP l'augmentaria centralment per unió als receptors Y5 (Whitcomb et al., 1997).

En rosegadors, a més de disminuir la ingesta i retardar el buidat gàstric, s'ha observat que l'administració perifèrica del PP estimula el sistema nerviós simpàtic i el consum d'oxigen incrementant la despesa energètica (Asakawa et al., 2003). En humans, la infusió intravenosa redueix la ingesta sense afectar el buidat gàstric (Batterham et al., 2003).

Amilina

L'amilina és un pèptid, cosegregat amb la insulina postprandialment per les cèl·lules β del pàncrees, que inhibeix el buidat i secreció gàstrics i la secreció de glucagó, disminuint la mida dels àpats. Estudis recents suggereixen la seva actuació via àrea postrema inhibint la ingesta induïda pel NPY (Morris i Nguyen, 2001).

L'amilina s'ha postulat com a senyal d'adipositat, ja que comparteix característiques comunes dels ja ben coneguts senyals insulina i leptina. L'amilina pot travessar la barrera hematoencefàlica i unir-se a receptors localitzats en les principals àrees cerebrals relacionades amb el control de l'homeòstasi energètica (Banks et al., 1995). La seva administració redueix la ingestió d'aliment de manera dosi-depenent (Rushing et al., 2000), i administracions repetides durant 6 dies provoquen una marcada alteració dels patrons d'ingestió amb una considerable pèrdua de pes per reducció del greix corporal. Igual que la leptina i la insulina, la secreció i

nivells circulants d'amilina estan correlacionats amb el grau d'adipositat corporal (Pieber et al., 1994).

Enterostatina

L'enterostatina és un pèptid segregat pel pàncrees exocrí com a resposta a la ingestió de greixos. La seva administració, tant central com perifèrica, disminueix específicament la ingestió de greixos en rosegadors (Okada et al., 1992). En els humans, la seva administració no ha mostrat cap efecte, ni sobre la ingestió d'aliment ni sobre la despesa energètica (Kovacs et al., 2003).

Apolipoproteïna A-IV

L'apolipoproteïna A-IV (APO A-IV) és una apolipoproteïna, de naturalesa glucoproteïca, segregada per l'intestí com a resposta a l'absorció de greixos i formació dels quilomicra (Qin i Tso, 2005). També s'ha observat la seva síntesi en el nucli hipotalàmic arquejat. En rata, l'administració exògena d'APO A-IV disminueix la mida de l'àpat, i de la ingesta, així com el guany de pes, mentre que l'administració d'anticossos contra l'APO A-IV produeix els efectes oposats (Fujimoto et al., 1993).

L'APO A-IV ha estat proposada com a nexa d'unió entre la regulació a curt i llarg termini del balanç energètic ja que la seva expressió és modificada per la insulina i la leptina (Tso et al., 2004).

1.1.1.2. GHRELINA, ÚNIC SENYAL GASTROINTESTINAL OREXIGÈNIC

La ghrelina és l'únic senyal perifèric endogen que presenta un efecte inductor de la gana incrementant la ingestió d'aliment (Kojima et al., 1999). És produïda majoritàriament per les cèl·lules oxíntiques del fundus de l'estómac, i en petites quantitats pel propi hipotàlem. S'ha identificat com a lligand endogen del receptor de l'hormona de creixement (GHS-R), el qual presenta una àmplia distribució a tot l'organisme que explicaria els molts efectes endocrins i no endocrins que presenta la ghrelina (Gnanapavan et al., 2002).

Els nivells de ghrelina augmenten sobtadament abans dels àpats ajustant-se a un patró horari que indicarien l'inici de la ingestió d'aliment (Cummings et al., 2004). Els experiments realitzats per Sugino i col·laboradors confirmen que els nivells de ghrelina s'ajusten perfectament a un patró alimentari definit; els animals entrenats a menjar en determinades hores del dia presenten un pic de ghrelina que precedeix als àpats, mentre que els que són alimentats *ad libitum* presenten uns nivells de ghrelina baixos i constants (Sugino et al., 2002). Així, la secreció preprandial de ghrelina podria ser part d'un reflex fisiològic cefàlic condicionat, possiblement estimulat pel sistema nerviós simpàtic, que prepara a l'organisme per a la ingestió de nutrients (Mundinger et al., 2006). Alhora s'ha observat que els increments en els nivells de ghrelina provoquen un augment en el nombre d'àpats iniciats, sense alteració de la seva mida.

Quant a la seva supressió postprandial, el mecanisme responsable és menys conegut. Els nivells de ghrelina disminueixen entre 1 i 2 hores després de menjar (Tshop et al., 2001), aquest descens no respon a una estimulació vagal, ni s'ha relacionat a la presència de nutrients o distensió al tracte gastrointestinal (Erdmann et al., 2004; Williams et al., 2003). Recentment s'ha vist que aquesta supressió podria ser dependent, en part, de la càrrega calòrica ingerida (Callahan et al., 2004). En humans, els nivells varien amb el ritme circadià juntament amb la leptina, i per tant són alts al matí i baixos a la nit (Cummings et al., 2001).

Entre els efectes de la ghrelina a nivell gastrointestinal trobem un potent increment de la ingestió d'aliment, un augment de la motilitat gastrointestinal i de la secreció gàstrica i una disminució en la secreció de insulina (Masuda et al., 2000). La forma desoctanoïl de la ghrelina estimula l'adipogènesi, té efectes cardiovasculars i està implicada en el control del creixement cel·lular (Bedendi et al., 2003; Thompson et al., 2004).

La ghrelina exerceix el seu control sobre la ingesta a l'hipotàlem, augmentant l'expressió de NPY i AgRP. La seva senyalització a l'hipotàlem pot ser per penetració directa al nucli arquejat via circulatòria, per activació dels receptors GHS de les aferències vagals que arriben al NTS i que es comuniquen amb l'hipotàlem o per activació directa de les neurones NPY/AgRP, induint la pròpia producció de ghrelina en aquesta zona (Korbonits et al., 2004). En experiments on s'administrava ghrelina intracerebroventricular s'ha observat un augment de l'expressió d'orexines en l'hipotàlem lateral i una inhibició de l'expressió de POMC (Riediger et al., 2003; Toshinai et al., 2003).

Hi ha dades que indiquen que la ghrelina, a més del seu control de la ingestió a curt termini, contribueix de forma significativa a la regulació a llarg termini del pes corporal (Cummings et al., 2005). Primer, els nivells circulants responen de manera compensatòria als canvis en el pes corporal, incrementant-se davant de pèrdues de pes i viceversa. Segon, la ghrelina influencia l'activitat neuronal de diferents àrees del cervell implicades en l'homeòstasi energètica a llarg termini. Tercer, l'administració crònica de ghrelina incrementa el pes corporal per inducció de hiperfàgia, promoció de la deposició de greixos i disminució de la taxa metabòlica i del catabolisme lípids. I, finalment, el bloqueig farmacològic de la ghrelina i l'absència de senyalització en ratolins ghrelina-deficients provoca disminució de la ingesta, del pes corporal i confereix resistència al desenvolupament d'obesitat induïda per la dieta (Wortley et al., 2005; Zigman et al., 2005).

Malgrat que s'ha vist que en individus obesos els nivells de ghrelina són baixos (Tshop et al., 2001), el que podria ser una adaptació fisiològica semblant a la de la leptina i que reafirmaria el seu paper en la regulació a llarg termini del pes corporal, en aquests individus no es presenta una supressió de la ghrelina postprandial el que podria contribuir a la perpetuació de l'estat obès (English et al., 2002). Diversos estudis presenten una significant hiperghrelinèmia en pacients amb la síndrome de Prader-Willi, que entre altres disfuncions es caracteritza per

presentar obesitat i hiperfàgia (Cummings i Shannon, 2003). Finalment cal destacar que la disminució dels nivells de ghrelina després d'un bypass gàstric semblen contribuir a les pèrdues de pes associades a aquest tipus de cirurgia (Cummings et al., 2002). Totes aquestes investigacions fan pensar que la inhibició farmacològica de la ghrelina podria jugar un paper clau en el tractament de l'obesitat.

1.1.2. MECANISMES DE CONTROL DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL SOBRE LA INGESTA

El control de la ingesta per part del SNC es dóna principalment a dos nivells: l'hipotàmic, el qual és considerat com a principal centre regulador de la ingesta, i el complex vagal dorsal, que rep i integra els senyals d'origen gastrointestinal. Tots dos sistemes es troben interconnectats.

1.1.2.1. L'HIPOTÀLEM, PRINCIPAL CENTRE REGULADOR DE LA INGESTA

Estudis clàssics realitzats ara fa unes sis dècades ja posaven de manifest el paper de l'hipotàlem com a centre controlador de la ingesta i del pes corporal (Stellar, 1954). Estudis basats en lesions i estimulacions elèctriques de determinades zones del cervell causaven profunds canvis en el pes corporal de les rates (Hoebel i Teitlebaum, 1966). Així, es va observar que lesions bilaterals a l'hipotàlem ventromedial (VMH) induïen hiperfàgia i obesitat, mentre que lesions de l'hipotàlem lateral (LHA) provocaven importants pèrdues de pes (Keeseey et al., 1976). Així, el VMH va ser proposat com centre del sadollament i el LHA com a centre de la gana. L'estimulació elèctrica del VMH inhibia la gana mentre que l'estimulació del LHA la incrementava (Bray i York, 1979). Posteriorment, nous experiments revelaren l'existència d'altres nuclis hipotalàmics implicats en els mecanismes de regulació de la ingestió d'aliment.

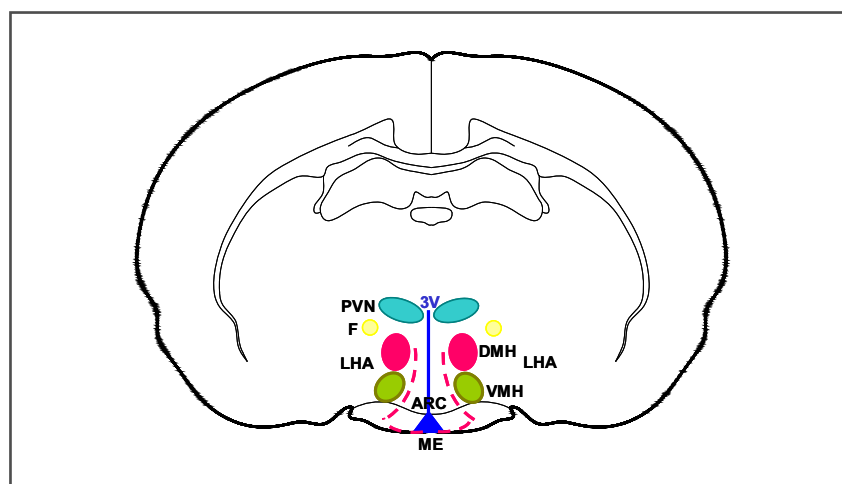


Figura 2. Anatomia de l'hipotàlem de rateta. Secció coronal de l'hipotàlem que mostra les posicions relatives dels diferents nuclis hipotalàmics; nucli arquejat (ARC), hipotàlem ventromedial (VMH), hipotàlem dorsomedial (DMH), nucli paraventricular (PVN) i hipotàlem lateral (LHA). ME: eminència mitja. F: fornix.

Hipotàlem ventromedial

Conegut com a centre hipotalàmic del sadollament, ha estat identificat com a diana clau de l'actuació de la leptina a nivell central, inhibint la ingestió d'aliment i estimulant la despesa energètica per tal de reduir el contingut de reserves de l'organisme.

Hipotàlem lateral

El clàssic centre hipotalàmic de la gana es caracteritza per presentar neurones sensibles a la glucosa que mediatitzen la marcada hiperfàgia induïda per una situació de hipoglucèmia (Bernardis i Bellinger, 1996). Rep les projeccions dels axons procedents del nucli arquejat de les neurones productores de NPY/AgRP i POMC/CART (Elmqvist et al., 1999) i es troba interconnectat amb el nucli del tracte solitari del tronc cerebral. En aquesta zona es dona la síntesi dels pèptids orexigènics hormona concentradora de melanina i orexines A i B.

Nucli arquejat

Conegut com a sensor metabòlic, actua integrant les diferents senyals perifèriques per tal de mantenir l'homeòstasi energètica (Funahashi et al., 2000). L'ARC engloba al tercer ventricle i es situa sobre l'eminència mitja formant un àrea on la barrera hematoencefàlica està modificada permetent l'entrada de pèptids i proteïnes com ara la insulina i la leptina (Friedman i Halaas, 1998; Schwartz et al., 1992). Presenta una elevada concentració de receptors de leptina i conté els cossos neuronals de les neurones productores dels pèptids orexigènics NPY i AgRP i l'anorexigènics POMC i CART.

Nucli paraventricular

El nucli paraventricular (PVN) és el principal lloc de síntesi de l'hormona alliberadora de corticotropina i de l'hormona alliberadora de tirotròpina (TRH). Nombroses vies neuronals implicades en el balanç energètic convergeixen en aquest nucli, que rep gran quantitat de les projeccions de les neurones sintetitzadores del NPY de l'ARC, orexines, POMC i galanina. El nucli PVN presenta un paper clau en la integració de senyals nutricionals procedents de l'eix hipotalàmic-hipofisari-tiroïdal (Neary et al., 2004).

Hipotàlem dorsomedial

L'hipotàlem dorsomedial es troba extensament connectat amb els altres nuclis hipotalàmics realitzant les funcions de integració i processament de la informació procedent d'aquests (Elmqvist et al., 1998).

1.1.2.2. EL COMPLEX VAGAL DORSAL

El complex vagal dorsal és l'encarregat de rebre i integrar els senyals de sadollament perifèrics generats a nivell gastrointestinal i que són transmesos per les fibres aferents vagals i

espinals del sistema nerviós simpàtic (Ritter et al., 1994). En aquest complex trobem el nucli del tracte solitari el qual integra tota la informació sensorial procedent del tracte gastrointestinal, abdominal i cavitat bucal generada per estimulació química o mecànica (Travers i Norgren, 1987), i l'àrea postrema que rep una estimulació hormonal directa per ser un punt on els senyals perifèrics, com la CCK, l'amilina i la leptina poden travessar la barrera hematoencefàlica i unir-se als seus receptors presents en aquesta àrea (Edwards et al., 1986; Lutz et al., 1998; Mercer et al., 1998). El complex vagal dorsal es troba recíprocament interconnectat amb l'hipotàlem a nivell dels nuclis PVN i LHA (Ricardo i Koh, 1978; Ter Host et al., 1989), a més de presentar receptors per a molts neuropèptids, com el NPY (Harsfstrand et al., 1986) i melanocortines (Mountjoy et al., 1994).

1.1.2.3. NEUROPÈPTIDS IMPLICATS EN EL CONTROL HIPOTALÀMIC DE LA INGESTA

Múltiples neuropèptids, orexigènics i anorexigènics, són produïts per l'hipotàlem actuant com a molècules efectores en la regulació de la ingestió d'aliment i homeòstasi energètica.

1.1.2.3.1. NEUROPÈPTIDS OREXIGÈNICS

Neuropèptid Y

El neuropèptid tirosina o neuropèptid Y (NPY) és un pèptid de 36 aminoàcids, molt abundant a l'hipotàlem (Allen et al., 1983); és considerat com un dels agents orexigènics més potents (Edwards et al., 1999). Els seus nivells hipotalàmics són un indicador de l'estat nutricional de l'organisme, propietat que el caracteritza com un regulador de la homeòstasi energètica. Els nivells de NPY i del seu ARNm són elevats durant els períodes de dejuni i disminueixen després de la ingestió d'aliment, com correspon a una molècula amb funcions orexigèniques (Sanacora et al., 1990; Swart et al., 2002). L'ARC és la principal regió d'expressió del NPY amb neurones que són projectades a altres nuclis hipotalàmics, com el nucli paraventricular, l'hipotàlem dorsomedial i l'hipotàlem lateral.

En rosegadors, una única administració intracerebroventricular de NPY estimula la ingestió d'aliment (Inui, 2000), i la seva administració crònica causa hiperfàgia mantinguda, disminució de la termogènesi i obesitat (Stanley et al., 1986). L'expressió del NPY a l'hipotàlem es troba incrementada respecte dels controls en diferents models animals que presenten alteracions en la ingestió d'aliment (Wilding et al., 1993; Williams et al., 1989).

Tot i els potents efectes orexigènics del NPY, els ratolins *knock-out* per a aquest gen no pateixen obesitat ni adipositat anormal (Thorsell i Heiling, 2002), tot i que sí redueixen la quantitat d'aliment consumit induïda pel dejuni (Bannon et al., 2000). Aquest fenomen s'explica per la redundància genètica existent en els complexos mecanismes de regulació homeostàtica, activant-se vies orexigèniques alternatives per tal de compensar el sistema o evitar un fracàs de l'homeòstasi energètica a l'organisme (Marsh et al., 1999).

El NPY mediatitza els seus efectes a través dels receptors específics, Y1, Y2, Y4, Y5 i Y6 (Wahlestedt i Reis, 1993). Entre aquests, els Y1 i Y5 han estat identificats com els receptors més importants en els efectes del NPY sobre la gana (Marsh et al., 1998; Mullins et al., 2001; Pedrazzini et al., 1998). El receptor Y5 és expressat en elevada proporció al LHA, zona hipotalàmica on el NPY actua com a potent estimulador de la gana (Williams et al., 2000). El receptor Y1 també està àmpliament expressat en el cervell i en altres òrgans.

La síntesi del NPY està regulada per senyals aferents: inhibidores com la insulina i la leptina, i estimuladores, com els glucocorticoides. Les neurones sintetitzadores del NPY són una diana potencial de la leptina, que inhibeix la seva síntesi i secreció, el que explicaria en part la capacitat de la leptina per produir hipofàgia i pèrdua de pes. La síntesi i secreció de NPY està incrementada en estats de deficiència energètica o d'increment de la demanda metabòlica (dejuni, exercici, diabetis, lactància) (Inui, 2000). Aquestes observacions indicarien la funció fisiològica del NPY de restablir el balanç energètic i les reserves grasses de l'organisme en condicions de dèficit energètic en les que senyals com la insulina i la leptina es troben inhibides.

Pèptid relacionat amb agouti

El pèptid relacionat amb *agouti* (AgRP) és un pèptid de 132 aminoàcids coexpressat amb el NPY per les neurones de l'ARC (Broberger et al., 1998). Aquest pèptid va ser descobert per la seva homologia a la proteïna *agouti*, proteïna de la pell que regula la pigmentació en ratolins i que expressada de forma constitutiva en el ratolí *Agouti* (*A^y/a*) provoca un fenotip caracteritzat pel color groc del pèl, obesitat, resistència a la insulina, hiperglucèmia i increment de la longitud corporal (Wilson et al., 1999). L'AgRP és un potent i selectiu antagonista dels receptors de les melanocortines, MC3 i MC4, implicats en el control del balanç energètic (Yang et al., 1999). D'aquesta manera l'AgRP antagonitza els efectes de l'hormona estimuladora de melanòcits α (α -MSH) donant lloc a un fenotip obès associat amb hiperfàgia, termogènesi disminuïda i increment de l'eficiència calòrica (Fan et al., 1997; Miltenberger et al., 1997).

L'AgRP i el NPY mantenen una relació funcional estreta i la seva expressió es troba modulada de manera similar sota diferents condicions fisiològiques (Mizuno i Mobbs, 1999; Ziotopoulou et al., 2000). Aquest fet es fa evident en casos de balanç energètic negatiu o de demanda energètica elevada, en què els nivells de leptina i insulina són baixos i els de ghrelina i corticosterona alts, estimulants-se així l'AgRP i el NPY a l'hora (Chen et al., 1999; Mizuno i Mobbs, 1999). La injecció central aguda d'AgRP provoca efectes molt marcats sobre la ingestió d'aliment, que es mantenen fins una setmana després (Rossi et al., 1998), mostrant una durada molt superior a la del NPY. L'administració crònica, igual que la del NPY, incrementa la ingesta diària i disminueix el consum d'oxigen, induint així una acumulació de greix corporal i dels nivells de leptina (Small et al., 2003). Els efectes de l'AgRP i el NPY són redundants, assegurant ambdós la ingestió energètica durant els períodes de manca d'aliment per evitar un balanç negatiu continuat (Leibowitz i Wortley, 2004).

Hormona concentradora de melanina

L'hormona concentradora de melanina (MCH) és un neuropèptid de 19 aminoàcids produït pels cossos neuronals que formen l'hipotàlem lateral. La MCH actua a través de dos receptors, MCH-1 i MCH-2 (Maulon-Feraille et al., 2002), que són presents en diferents àrees cerebrals, el que suggereix que la MCH a més de tenir un paper rellevant en el control del pes corporal (Leibowitz i Wortley, 2004), participa en altres funcions (reproducció, aprenentatge i memòria) (Toumaniantz et al., 2000).

Diferents línies d'investigació han manifestat que la MCH juga un paper clau en la regulació de la ingesta i en l'homeòstasi energètica. L'administració aguda intracerebroventricular de MCH augmenta el consum d'aliment i disminueix la despesa energètica en rates; infusions cròniques de MCH en ratolins amb una dieta rica en greixos els produeixen hiperfàgia persistent acompanyada d'un increment d'adipositat, hiperinsulinèmia i hiperleptinèmia (Gomori et al., 2003; Ito et al., 2003). En ratolins transgènics que sobreexpressen MCH s'ha observat una marcada hiperfàgia, obesitat i resistència a la insulina (Ludwig et al., 2001). Per altra banda, els ratolins *knockout* per a la MCH presenten un fenotip prim caracteritzat per hipofàgia i un increment de la despesa energètica (Shimada et al., 1998).

Els estudis d'expressió gènica de la MCH mostren semblances i diferències respecte dels pèptids orexigènics produïts al nucli arquejat. Així, la MCH coincideix amb el NPY i l'AgRP en ser activada durant els períodes de balanç energètic negatiu i d'alta demanda energètica; mentre que difereix d'aquests en funcionar independentment de la leptina i en no respondre a senyals nutricionals de baixa disponibilitat i utilització de glucosa. També difereix en els seus potents efectes anabòlics sobre la reducció de la despesa energètica, la oxidació de lípids i la termogènesi (Leibowitz i Wortley, 2004).

Orexines

Les orexines, també conegudes com hipocretines ja que van ser descobertes simultàniament per dos grups (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998), són pèptids orexigènics produïts per neurones situades en l'hipotàlem lateral i dorsomedial. Codificades pel mateix gen en l'actualitat es coneixen dos tipus, la orexina A i la B, les quals presenten una homologia del 46% (Sakurai et al., 1999). Les orexines actuen a través de dos receptors específics, OX_1 i OX_2 , que es troben àmpliament distribuïts pel SNC i presents en alguns teixits perifèrics, l' OX_1 és expressat en el teixit adipós marró i l' OX_2 en la medulla adrenal (Rodgers et al., 2002). L'àmplia distribució dels seus receptors juntament amb les múltiples extensions per diferents àrees del SNC que presenten les neurones que sintetitzen les orexines, suggereixen que, a més d'intervenir al control del metabolisme energètic, les orexines es troben associades a altres funcions a l'organisme (Willie et al., 2001). S'han relacionat estretament amb el control dels estats de son i vigília, observant-se narcolèpsia quan la seva acció es bloqueja en animals d'experimentació (Taylor i Samson, 2003).

El sistema de les orexines és activat selectivament per senyals que indiquen un dèficit en l'estat nutricional. Així, la seva expressió és estimulada en el dejuni i la hipoglucèmia induïda per insulina (Cai et al., 1999). Recentment, s'ha vist que la meitat de les neurones productores d'orexines expressen receptors per a la leptina, i que aquesta citoquina, juntament amb la glucosa i la ghrelina poden actuar com a senyals reguladors de la seva producció (Sakurai, 2003). S'ha postulat també que les orexines poden actuar com a hormones perifèriques implicades en l'homeòstasi energètica ja que s'ha trobat que són expressades a la mucosa gàstrica, intestí i pàncrees (Kirchgessner i Liu, 1999), i que la seva administració perifèrica incrementa els nivells d'insulina en sang (Nowak et al., 2000).

Galanina

La galanina (GAL) és un pèptid originàriament aïllat a l'intestí i que posteriorment s'ha trobat àmpliament distribuït pel SNC on modula una gran varietat de processos fisiològics a més de la conducta alimentària (memòria, dolor, reproducció, balanç hídric i regulació neuroendocrina) (Leibowitz et al., 1998). A través de la unió als seus receptors, GAL-1 i GAL-2, presents en moltes regions hipotalàmiques i el complex vagal dorsal, inhibeix la secreció de molts pèptids intestinals incrementant la gana, amb certa preferència sobre el consum de greixos (Zhenjun et al., 2004). Cal tenir en compte també que una dieta rica en greixos i un increment en els lípids circulants estimulen la seva secreció.

Tot i tenir efectes estimuladors de la gana, la via de funcionament de la GAL és diferent del NPY. Tant la galanina com el NPY estan estimulats per l'acció de la insulina (Wang i Leibowitz, 1997); la leptina, en canvi, inhibeix fortament l'expressió del NPY mentre que té pocs efectes sobre l'expressió de la GAL, observant-se només una lleu reducció de la seva expressió en el nucli paraventricular (Cheung et al., 2001). Aquesta resposta diferent a la leptina es pot explicar pel fet que les neurones productores de galanina no disposen de massa receptors de leptina (Cheung et al., 2001). La restricció energètica disminueix els nivells de leptina i incrementa l'expressió de NPY, mentre que els nivells d'expressió de GAL no s'alteren o tendeixen a disminuir (Brady et al., 1990). A més, la ingestió d'aliment induïda per la galanina és menys intensa i de més curta durada que la induïda pel NPY (Kalra et al., 1999). S'ha postulat que la GAL té la funció de restablir el balanç glucídic en una situació metabòlica en que la ingestió de glúcids i el seu metabolisme són mínims. Així, la galanina incrementa el metabolisme glucídic al múscul i disminueix la capacitat de metabolització de lípids (Leibowitz i Wortley, 2004).

1.1.2.3.2. NEUROPÈPTIDS ANOREXIGÈNICS

Trànscrip regulat per cocaïna i amfetamina

El trànscrip regulat per cocaïna i amfetamina (CART) és un dels darrers pèptids afegits a la llista de neuropèptids implicats en el control de la conducta alimentària. Va ser identificat com

a trànscrip que augmentava després del tractament de les rates amb cocaïna o amfetamines (Douglass et al., 1995), i posteriorment es va identificar com a nou senyal anorexigènic (Elmqvist, 1999). El CART és expressat majoritàriament en el nucli arquejat (Elias et al., 1998) i actua sobre el nucli paraventricular regulant funcions autonòmiques i neuroendocrines relacionades amb l'alimentació sense modificació de la despesa energètica. Hi ha dades que indiquen de l'existència d'un receptor específic pel CART del què es coneix el comportament farmacocinètic però que encara no s'ha pogut identificar (Vicentic et al., 2005).

Els nivells de CART a l'ARC disminueixen amb el dejuni (Kristensen et al., 1998), i en estats de diabetis, demostrant així que la regulació de la seva expressió està molt relacionada amb la disponibilitat de nutrients i amb l'estat hormonal perifèric (Li et al., 2002). Sembla que existeix una estreta relació entre les vies de senyalització del CART i la leptina (Niimi, 2001), la qual podria ser explicada per la presència de receptors de leptina en les mateixes neurones de l'ARC encarregades de l'expressió del CART (Elias et al., 1998). La rata *fa/fa* i el ratolí *ob/ob* presenten una menor expressió del CART al nucli arquejat, que es normalitza amb l'administració de leptina (Larsen et al., 2000). Els nivells hipotalàmics del CART també es veuen incrementats per acció de la insulina o els glucocorticoides (Li et al., 2002; Vrang et al., 2003). Els nivells del CART semblen també estar afectats pel consum de greixos i l'increment dels lípids circulants. D'aquesta manera, una dieta hiperlipídica o una situació d'obesitat, incrementen els nivells del CART en relació a una dieta pobre en lípids o en individus amb normopes (Wortley et al., 2004).

El CART aparentment pot modular les accions del NPY; l'administració del CART bloqueja la ingestió d'aliment induïda pel NPY tant en rates normals com en rates sotmeses a dejuni (Larsen et al., 2000). El tractament crònic intracerebroventricular no només implica una disminució de la ingesta sinó que també redueix el pes corporal, tant en animals obesos com amb normopes (Larsen et al., 2000). Cal dir que el CART pot produir dificultats motores (Abbot et al., 2001) i aversió a alguns aliments (Aja et al., 2002), arribant a casos de supressió total de la ingestió d'aliment. Cal mencionar que en un estudi en el qual el CART era administrat intrahipotalàmicament, aquest presentava paradoxalment un efecte orexigènic (Abbott et al., 2001).

Melanocortines

Les melanocortines són un grup de pèptids derivats del precursor proopiomelanocortina (POMC), el qual s'expressa significativament en diferents teixits de mamífers (Bertagna, 1994; Castro i Morrison, 1997; Smith i Blalock, 1981). El producte derivat de POMC en cada cas ve determinat per l'expressió específica d'endoproteases (convertases) a cada teixit (Bloomquist et al., 1991; Zhou et al., 1993). A la hipòfisi el producte predominant de POMC i resultant de l'acció de la convertasa 1 és l'hormona adrenocorticotropina (ACTH), molècula que s'uneix al receptor de melanocortines 2 localitzat al còrtex adrenal, estimulando així l'alliberament i la

síntesi de glucocorticoides. En el nucli arquejat, l'ACTH és processat per la convertasa 2 produint l'hormona estimulant de melanòcits α (α -MSH), lligand endogen dels receptors de melanocortines que es troben al cervell, MC3 i MC4, implicats en el control de la gana i homeòstasi energètica (Pritchard et al., 2002), i únic sistema biològic que presenta tant un agonista (α -MSH) com un antagonista (AgRP) endogen (Neary, 2004).

L'administració central d' α -MSH inhibeix la ingestió d'aliment i disminueix el pes corporal, a més d'inhibir l'efecte estimulador de la gana per part de l'AgRP (Rossi et al., 1998). Ratolins deficients en POMC desenvolupen hiperfàgia i obesitat de la mateixa manera que ho fan els ratolins deficients en els receptors MC3 i MC4 (Chen et al., 2000; Yaswen et al., 1999). S'ha postulat un mecanisme de funcionament de les melanocortines segons el qual l' α -MSH s'uniria al receptor MC4 per activar-lo i disminuir la ingestió d'aliment (Rossi et al., 1998); mentre que l'AgRP competiria per aquest receptor amb l' α -MSH, estimulament la gana (Graham et al., 1997). Durant els períodes de balanç energètic negatiu, s'indueix la disminució de l'expressió del gen de la POMC en el nucli arquejat (Mizuno et al., 1998), i augmenta l'expressió d'AgRP (Mizuno i Mobbs, 1999), de manera que l'AgRP competirà amb l' α -MSH i reduirà les seves accions sobre el receptor MC4. En canvi, en condicions de balanç energètic positiu, un increment en l'alliberament de l' α -MSH provoca una atenuació de la ingesta i un increment de l'activitat simpàtica responsable de promoure efectes metabòlics que restringeixen el guany de pes corporal durant l'excés d'ingestió energètica (Leibowitz i Wortley, 2004). La POMC és coexpressada amb el CART al nucli arquejat i, igual que succeeix amb aquest, l'administració de leptina estimula l'expressió de la POMC (Cowley et al., 2001).

Estudis genètics han demostrat l'indispensable paper del sistema de les melanocortines en la regulació del pes corporal en humans (Krude et al., 1998). Les mutacions tant del gen de la POMC, com del gen que codifica per la convertasa 1 i dels receptors de melanocortines MC3 i MC4, estan associades al desenvolupament d'obesitat en humans (Farooqi et al., 2006; Jackson et al., 1997). Això ha convertit el sistema de les melanocortines en una prometedora diana terapèutica pel tractament de l'obesitat.

Hormona alliberadora de corticotropina

L'hormona alliberadora de corticotropina (CRH) a més de ser coneguda com el principal regulador fisiològic de la secreció d'ACTH, s'ha postulat com un agent endogen amb efectes anorèctics i termogènics propis (Denis, 1999). S'ha observat que la secreció de CRH al nucli paraventricular inhibeix la gana en absència d'estrès (Crespi et al., 2004). L'acció de la CRH és mitjançada a través de dos subtipus de receptors, CRH-1 i CRH-2 (Chalmers et al., 1996; Turnbull i Rivier, 1997), aquest últim principal responsable dels efectes supressors de la gana i termogènics de la CRH i pèptids relacionats (Martínez et al., 1998; Smagin et al., 1998).

L'administració aguda de CRH al nucli paraventricular disminueix espontàniament la ingestió d'aliment (Levine i Billington, 1989; Morley, 1987), i l'administració de forma crònica provoca anorèxia i una progressiva pèrdua de pes (Schwartz et al., 1995). Contràriament, el bloqueig de la seva acció augmenta la gana, tant basal com la induïda per NPY, el que suggereix que la CRH podria actuar neutralitzant les accions de els senyals orexigèniques (Heinrichs et al., 1991; Hulse et al., 1995).

La CRH és sensible a l'acció de senyals provinents de la perifèria indicadores de l'estat de les reserves energètiques. Així, la leptina pot regular tant l'expressió de CRH al nucli paraventricular com la del seu receptor. S'ha observat que la leptina augmenta l'expressió del receptor CRH-2 a l'hipotàlem ventromedial, una estructura clau en el control de la secreció de insulina i regulació del balanç energètic (Denis, 1999). En canvi, els glucocorticoides inhibeixen l'expressió de CRH facilitant les accions del NPY aconseguint un increment de la ingesta (Crespi et al., 2004).

Neurotensina

La neurotensina és un neuropèptid produït als nuclis hipotalàmics ARC, PVN i DMH i que s'ha postulat com a important mediador de les accions sobre la gana de la leptina a nivell central (Cui et al., 2005). L'administració de neurotensina a nivell del paraventricular disminueix la ingesta (Alexander et al., 1989; Stanley et al., 1983) i s'ha vist que disminueix els efectes orexigènics de la MCH quan són coadministrats (Tritos et al., 1998).

Són moltes les dades que relacionen estretament la neurotensina amb la leptina. El ratolí deficient en leptina *ob/ob* (Wilding et al., 1993) o la rata insensible a l'acció de la leptina *fa/fa* (Beck et al., 1998) presenten una baixa expressió de neurotensina. Contràriament, l'administració intracerebroventricular de leptina estimula significativament la síntesi de neurotensina en associació amb una reducció de la gana (Beck et al., 1998; Sahu, 1998). A més, la immunoneutralització amb anticossos contra la neurotensina o la utilització d'antagonistes dels receptors de neurotensina anul·len completament els efectes inhibidors de la ingestió d'aliment induïts per la leptina (Sahu et al., 2001).

1.1.2.4. NEUROTRANSMISSORS IMPLICATS EN EL CONTROL DE LA INGESTIÓ D'ALIMENT

Neurotransmissors com la serotonina, la noradrenalina, la histamina, la dopamina i els endocannabinoides es troben estretament relacionats amb el control central de la ingesta i homeòstasi energètica, a més de ser fins ara diana de les més clàssiques aproximacions farmacològiques per al tractament de l'obesitat. Juntament amb els neuropèptids, també són produïts a l'hipotàlem actuant com a molècules efectores en la regulació del balanç energètic.

Serotonina

La serotonina, o 5-hidroxi-triptamina (5-HT) és un important modulador de diferents processos fisiològics a l'organisme, entre ells la gana (Vanhoutte et al., 1993). Des de fa tres dècades, la serotonina és reconeguda com a senyal de sadollament (Blundell, 1977) i actualment és una de les principals dianes terapèutiques per al tractament de l'obesitat. Dels 14 subtipus de receptors de serotonina que es coneixen fins ara, és bàsicament a través dels receptors 5-HT_{1B} i 5-HT_{2C} que la serotonina indueix el sadollament (Halford et al., 2005). L'alteració d'aquest últim, el 5-HT_{2C}, produeix un quadre de hiperfàgia, obesitat i diabetis tipus 2 (Nonogaki et al., 1998).

La serotonina i els seus agonistes inhibeixen la gana, en ser administrats tant central- com perifèricament en animals alimentats *ad libitum* o privats de menjar (Leibowitz, 1989; Heinrichs et al., 1998). Els estimulants d'aquesta monoamina redueixen el guany de pes i incrementen la despesa energètica tant en animals com humans per acció a nivell dels nuclis hipotalàmics paraventricular, ventromedial i supraquiasmàtic (Leibowitz, 1989).

S'ha observat que la leptina incrementa el moviment de serotonina (Calapai et al., 1999), el que podria indicar que els efectes de reducció de pes de la leptina podrien en part ser mediat per un increment en el senyalització de la serotonina. Probablement el marcat efecte hipofàgic de la serotonina és mitjançat pel sistema de les melanocortines; s'ha observat que l'activació dels receptors 5-HT_{2C} promou l'alliberament de l' α -MSH i que el bloqueig dels receptors MC3 i MC4 és suficient per atenuar els efectes anorèctics dels agents serotoninèrgics (Heisler et al., 2002; 2003). També s'ha observat que l'activació del receptor 5-HT_{1B} inhibeix l'alliberament de l'AgRP i la del receptor 5-HT_{2A} disminueix els nivells del NPY (Halford et al., 2007; Heisler et al., 2006).

Estudis més recents, centren la seva atenció en el receptor 5-HT₆, el qual també s'ha vist que es troba implicat en la regulació de la gana i del pes corporal (Shacham et al., 2005).

Noradrenalina

La importància de la noradrenalina (NA) en la regulació central de la ingesta ha estat manifestada en diferents experiments (Bray i Greenway, 1999). Lesions del feix noradrenèrgic ventral aboleixen l'alliberació de NA en l'àrea perifornical de l'hipotàlem provocant un guany de pes (Ahlskog i Hoebel, 1982) i bloquejant l'efecte anorèctic d'amfetamines i dietilpropió (Borsini et al., 1992). El bloqueig de la síntesi de NA per bloqueig de la tirosina hidroxilasa en l'àrea perifornical incrementa la gana (Leibowitz i Brown, 1980). Infusions de NA a nivell del nucli VMH augmenten la ingestió d'aliment, disminueixen l'activitat simpàtica i poden produir obesitat (Shimazu et al., 1986). S'ha observat que el ratolí *ob/ob* presenta uns nivells elevats de NA al nucli paraventricular, el que podria indicar que la leptina inhibeix l'alliberació de NA en aquesta

àrea (Oltmans, 1983). L'augment de la senyalització de noradrenalina en el nucli paraventricular podria contribuir a la hiperfàgia induïda per la deficiència en leptina (Schwartz, 2000).

L'acció de la NA, incrementant o disminuint la ingesta, depèn del tipus de receptor adrenèrgic (AR) implicat en l'acció (Leibowitz, 1970). A través dels α_1 AR presents al nucli paraventricular o dels β_2 AR localitzats a l'àrea perifornical i hipotàlem lateral, la NA disminueix la ingesta (Leibowitz, 1986), mentre que l'activació dels α_2 AR situats al nucli PVN l'estimula (Tsuji i Bray, 1992). Els β_3 AR també s'han relacionat amb una disminució de la ingesta quan s'administren agonistes a nivell central (Tsuji i Bray, 1992), encara que la seva importància recau més en els seus efectes perifèrics, on la seva activació estimula la lipòlisi i la termogènesi.

Dopamina

L'increment de la senyalització dopaminèrgica a nivell hipotalàmic està associada amb una inhibició de la gana. Actualment es coneixen 5 tipus diferents de receptors de dopamina, D_1 , D_2 , D_3 , D_4 i D_5 , (Terry et al., 1995). A través de D_1 i D_5 la dopamina i els seus agonistes redueixen la durada de la ingestió d'aliment i disminueixen la freqüència d'episodis d'alimentació, mentre que l'acció sobre el receptor D_2 redueix l'índex d'àpats. La utilització d'antagonistes per al receptor D_1 , com el sulpiride, promou un augment de la ingesta (Parada et al., 1989).

S'ha observat que el ratolí *ob/ob* presenta uns nivells de dopamina al nucli arquejat reduïts, fet que podria contribuir a la hiperfàgia d'aquests animals leptina-deficients (Oltmans, 1983).

Histamina

Els primers indicis que relacionaven el sistema histaminèrgic amb el control de la ingesta estaven basats en observacions clíniques en les que es mostrava que alguns antipsicòtics amb activitat antihistamínica estimulaven la ingestió d'aliment i que incrementaven el pes corporal (Morimoto et al., 2001). Aquests fàrmacs són potents bloquejants del receptor d'histamina H_1 (Hill i Young, 1978; Taylor i Richelson, 1980), el qual ha estat relacionat amb la modulació de la gana (Lecklin et al., 1998).

La histamina disminueix la gana a través dels receptors H_1 presents en els nuclis hipotalàmics ventromedial i paraventricular, mentre que els receptors H_3 són autoreceptors presents en les mateixes neurones histaminèrgiques a través dels quals la histamina inhibeix la seva pròpia alliberació (Sakata et al., 1994). L'administració d'antagonistes H_1 incrementa la ingestió d'aliment i promou un guany de pes, mentre que els antagonistes H_3 provoquen la seva disminució per increment dels nivells d'histamina a nivell sinàptic (Hancock i Brune, 2005).

La generació del ratolí *knockout* pel receptor H_1 de la histamina ha permès evidenciar la relació existent entre el sistema histaminèrgic i la leptina; en aquest *knockout* la supressió de la gana induïda per la leptina es veu disminuïda (Maridot et al., 1999). També s'ha vist de

l'existència d'una associació funcional entre la histamina i altres reguladors de la gana, com el NPY, el pèptid YY i la bombesina (Maridot et al., 2001).

Endocannabinoides

Els cannabinoides endògens, com l'anandamida actuen com agents orexigènics interactuant sobre el seu receptor hipotalàmic CB₁, un efecte que és especialment intens en situacions de dejuni (Vickers i Kennett, 2005). En el sistema dels endocannabinoides trobem un altre subtipus de receptor, el CB₂, que es troba associat a cèl·lules del sistema immune (Galieue et al., 1995; Klein et al., 1998), i fins i tot hi ha dades que suggereixen de l'existència d'un tercer tipus, el CB₃ (Breivogel et al., 2001). El possible paper d'aquests en el control energètic roman sense aclarir. S'ha observat que els nivells d'endocannabinoides fluctuen amb l'estat nutricional i estan augmentats en l'obesitat, el que implica una més gran activació del seu receptor, promovent un increment de pes i el desenvolupament de diferents factors de risc cardiometabòlic (Engeli et al., 2005). El receptor CB₁ també està present en altres òrgans associats amb la regulació energètica, com ara el tracte gastrointestinal i el teixit adipós (Wenger i Moldrich, 2002; Pagotto et al., 2006). Un estudi molt recent en el qual es mesura l'activitat dels endocannabinoides al teixit adipós blanc (TAB) visceral suggereix una correlació entre l'increment de greix abdominal i la desregulació del sistema perifèric endocannabinoide en l'obesitat humana (Bluher et al., 2006).

En nombroses espècies, inclosa la humana, l'administració de cannabinoides provoca un increment de la gana, promou un augment del pes corporal, estimula la lipogènesi en el TAB i el fetge, i empitjora la captació de glucosa per part del múscul (Pagotto et al., 2006). El sistema endocannabinoide interacciona amb altres agents involucrats en la regulació de la gana i el pes corporal, com ara la leptina, la ghrelina, el NPY i les melanocortines (Fride et al., 2005). La leptina redueix els nivells hipotalàmics d'endocannabinoides (Di Marzo et al., 2001), mentre que els antagonistes de CB₁ eviten l'increment de la ingesta observat per la inhibició de la via de les melanocortines (Verty et al., 2004) i per l'estimulació de la via del NPY (Arnone et al., 1997).

1.2. MECANISMES DE CONTROL DE LA DESPESA ENERGÈTICA

Mantenir la nostra temperatura estable és necessari per tal de preservar la plena capacitat funcional de l'organisme independentment de la temperatura ambiental. A fi de compensar les pèrdues de calor envers un medi amb temperatures més baixes, l'homeotèrmia requereix la producció constant de calor; aquestes necessitats es cobreixen en gran part mitjançant el calor residual resultant de l'activitat metabòlica i de l'exercici. En moltes ocasions, però, –repòs, exposició al fred– aquestes fonts no són suficients i és necessari el consum directe de l'energia química dels nutrients per generar calor (Alemany, 1999). Aquest procés de generació de calor a partir de l'oxidació de nutrients procedents tant de la dieta com de les reserves internes i que

complementa la calor produïda per l'exercici i els processos metabòlics rep el nom de termogènesi adaptativa (Silva, 2006).

La termogènesi adaptativa, no és només un mecanisme induïble pel fred que permet mantenir la temperatura corporal, sinó que, juntament amb la ingesta és un important sistema regulador de la massa d'energia emmagatzemada i per tant, del pes corporal (Dulloo et al., 2004; Leibel et al., 1995; Major et al., 2007). La termogènesi adaptativa pot ser induïda per una excessiva disponibilitat de substrats energètics i permet eliminar l'excés d'energia ingerida de manera que s'ajustin les disponibilitats energètiques amb més precisió (Dulloo et al., 2004; Stirling i Stock, 1968). La termogènesi és, doncs, un mecanisme que també permet eliminar en forma de calor qualsevol excés d'energia, evitant que qualsevol superàvit energètic provoqui necessàriament un augment de les reserves grasses i, per tant, del pes corporal.

La producció adaptativa de calor es produeix essencialment mitjançant tres tipus de mecanismes: la tremolor, els cicles de substrats i l'oxidació ineficient de substrats; i els principals òrgans responsables d'aquesta producció són el múscul esquelètic, el teixit adipós marró (TAM) i, en menor grau, el fetge.

1.2.1. TERMOGÈNESI AL MÚSCUL ESQUELÈTIC

El múscul esquelètic, a més de poder generar calor residual de manera voluntària al realitzar exercici, és el principal responsable de la termogènesi involuntària com a resposta a una exposició al fred (tremolor). Les baixes temperatures obliguen l'organisme a reaccionar ràpidament oxidant qualsevol substrat metabòlic susceptible de ser oxidat per tal de mantenir l'homeotèrmia i assegurar-se la supervivència. El primer mecanisme que es dispara inicialment és la tremolor, que es produeix quan els músculs abductors i adductors de la musculatura esquelètica es contrauen i es relaxen ràpidament i successivament. Aquesta contracció muscular no dona lloc a cap treball útil, sinó que tan sols resulta en un consum d'energia (ATP) que es desprèn en forma de calor.

La tremolor és un mecanisme d'emergència que es posa en funcionament momentàniament en les fases inicials de l'exposició al fred, evitant l'aparició d'hipotèrmia, mentre s'activen mecanismes de generació de calor més efectius i d'acció continuada en el TAM.

1.2.2. TERMOGÈNESI AL TEIXIT ADIPÓS MARRÓ

Almenys en rosegadors, el TAM és el principal teixit responsable de la termogènesi adaptativa, ja sigui induïda per les baixes temperatures (termogènesi no tremolosa) o per la dieta (termogènesi induïda per la dieta) (Rothwell i Stock, 1979). El TAM és un teixit adipós que igual que el teixit adipós blanc acumula greix de reserva en l'interior de les seves cèl·lules, però que presenta unes peculiaritats que el diferencien del TAB; el TAM està realment especialitzat en generar calor.

El TAM es caracteritza per una distribució perifèrica respecte del nucli d'òrgans vitals en forma de petits dipòsits dispersos. Es diferencia morfològicament del TAB per presentar una gran quantitat de petites vacuoles lipídiques en lloc d'una sola, el que li representa un important augment de la superfície d'interacció entre citoplasma i vacuola. Aquest increment de superfície augmenta l'àrea sobre la qual poden actuar les lipases encarregades de mobilitzar les reserves grasses sota condicions de mobilització de la despesa energètica. El TAM presenta una elevada irrigació sanguínia, controlada de manera independent pels sistema nerviós autònom (Sell et al., 2004; Yahata et al., 1983) el que li confereix una gran capacitat d'aportació d'oxigen i substrats susceptibles d'oxidació, a més d'una ràpida difusió de la calor generada cap a la resta de l'organisme. Hi ha una important presència de terminals nerviosos simpàtics en tot el teixit i una gran quantitat de mitocondries que li confereixen una elevada capacitat oxidativa (Cinti, 1999).

L'elevada capacitat termogènica del TAM és deguda a la presència d'una proteïna mitocondrial que s'expressa específicament en aquest teixit, la proteïna desacobladora 1 (UCP1) (Nicholls i Locke, 1984). L'activació de la UCP1 permet dissipar en forma de calor el gradient de protons generat per l'activitat de la cadena respiratòria, desacoblant així l'oxidació de combustible de la síntesi d'ATP (Ricquier, 2005). Aquesta proteïna és activada per la presència d'àcids grassos (Huang, 2003) i, en manca aquests, perquè cessa l'estimulació o perquè s'han oxidat massivament, la UCP1 torna a adoptar la seva configuració basal i la membrana mitocondrial es tanca forçant els protons a passar pel sistema generador d'ATP (Jezek et al., 1998).

El 1996 va ser publicat el descobriment de dues proteïnes mitocondrials suposadament desacobladores, la UCP2 i la UCP3, que presenten una elevada homologia amb la UCP1 però que no s'expressen de manera exclusiva al TAM (Nagase et al., 1996; Rolfe i Brand, 1996) i que s'ha postulat que podrien ser responsables de la termogènesi adaptativa en els teixits en què s'expressen. La UCP2 s'expressa en molts teixits mentre que la UCP3 ho fa majoritàriament al TAM i al múscul esquelètic (Boss et al., 2000; Ricquier i Bouillaud, 2000). Malgrat l'existència de diversos estudis que relacionen certs polimorfismes de les UCP2 i UCP3 amb l'obesitat, baixes taxes de despesa energètica i disminució de la capacitat oxidativa dels lípids (Argyropoulos et al., 1998; Le Fur et al., 2004; Walder et al., 1998), no està gens clara la funció fisiològica d'aquestes proteïnes homòlogues de la UCP1 i si realment són mediadores de la termogènesi a l'organisme. De fet, s'ha pogut demostrar que l'absència d'UCP2 o UCP3 no afecta la capacitat termogènica davant del fred (Nedergaard i Cannon, 2003). Actualment, són molts els estudis que atribueixen altres funcions a aquestes proteïnes desacobladores, com ara reguladores de la utilització dels lípids com a substrat, controladores de la secreció d'insulina, transportadores d'àcids grassos a través de la mitocondria o controladores de la producció d'espècies reactives de l'oxigen (Dulloo et al., 2004).

1.2.3. MECANISMES DE CONTROL DE LA TERMOGÈNESI

La termogènesi es troba sota el control del sistema nerviós simpàtic. La noradrenalina alliberada per les terminals simpàtiques estimula la producció de calor unint-se als receptors β_3 -adrenèrgics presents en grans quantitats en els adipòcits marrons (Lowell i Flier, 1997). L'exposició al fred o una dieta rica en greixos estimulen crònicament l'activitat simpàtica del TAM, el que dona lloc a la seva hipertròfia per estimulació de la proliferació dels preadipòcits marrons, així com tota una sèrie de canvis selectius, com són l'increment de la quantitat de mitocondries i del flux sanguini. Aquesta situació també induïx l'expressió de gens específics que donen lloc a la síntesi de proteïnes que permeten un increment de la capacitat termogènica, com ara la UCP1 que augmenta la seva concentració en la membrana mitocondrial interna, la lipoproteïna lipasa (LPL) que hidrolitza els triacilglicerols, els transportadors de glucosa que afavoreixen la disponibilitat de substrats, la tiroxina 5'-desiodasa que afavoreix la síntesi de triiodotironina que potencia els efectes de la noradrenalina, i els propis receptors adrenèrgics. L'expressió de la UCP1 també està regulada per diferents receptors nuclears i cofactors, com el receptor activat de proliferació peroxisomal γ (PPAR γ) o el seu coactivador (PGC-1) (Lowell i Spiegelman, 2000).

Treballs més recents exposen un nou concepte dels mecanismes de control de la termogènesi adaptativa. Dulloo i els seus col·laboradors postulen l'existència d'un sistema de control dual de la termogènesi (Dulloo et al., 2004). Aquest control dual inclou un primer sistema de resposta no específic, el qual es troba sota el control del sistema nerviós simpàtic i que actua ràpidament davant de canvis ambientals com l'estrès, els dèficits energètics, excessos d'energia ingerida, deficiència de nutrients essencials, exposició al fred o infeccions. Els òrgans i teixits responsables d'aquest control no específic serien el TAM, fetge i ronyons, tots tres caracteritzats per una elevada taxa metabòlica específica. El segon sistema seria un mecanisme de control específic del teixit adipós blanc (Dulloo i Jacquet, 2001), independent del control del sistema nerviós simpàtic, d'actuació molt més lenta i que operaria principalment a través del múscul esquelètic. Aquest segon sistema s'activaria com a resposta dels canvis produïts en les reserves grasses de l'organisme i jugaria un paper molt important en l'atenuació i correcció de les desviacions del pes corporal respecte del valor fixat (ponderostat).

La termogènesi adaptativa, igual que la ingesta, també es troba sota la influència de les principals hormones moduladores del metabolisme energètic (Silva, 2006), com són la leptina, la insulina, els glucocorticoides, els andrògens, els estrògens i les hormones tiroïdals.

1.3. MECANISMES DE CONTROL EXERCITS PEL TEIXIT ADIPÓS BLANC

En els darrers anys, la idea de què el teixit adipós blanc és un teixit amb la funció exclusiva d'emmagatzemament de reserves ha estat substituïda per un nou concepte, el de TAB com a òrgan endocrí difús que participa de manera molt activa en la regulació de la homeòstasi

energètica i d'altres funcions de l'organisme (Ahima, 2006; Flier, 2004). El TAB no sols té la capacitat d'acumular greix quan l'aportació energètica és excessiva, i de mobilitzar-lo quan l'organisme necessita energia, sinó que també és responsable de la síntesi i secreció de senyals múltiples que li permeten una complexa interacció amb el cervell i altres òrgans perifèrics. Aquests senyals adipocitaris sintetitzats com a resposta de canvis nutricionals, neuronals i hormonals, permeten un control de la ingesta, la despesa energètica, la resposta immune i altres funcions neuroendocrines.

El TAB, a més d'estar format majoritàriament per adipòcits madurs, presenta altres tipus cel·lulars de suport; com ara, preadipòcits i cèl·lules de l'estroma vascular. Dues terceres parts de les cèl·lules són adipòcits madurs que poden variar en diàmetre i volum en funció de l'edat i el desenvolupament d'obesitat (Hauer, 2004). Els preadipòcits infiltrats a la massa adiposa a més de ser les precursoras dels adipòcits madurs, es comporten també com a cèl·lules mare mesenquimals multipotencials capaces de diferenciar-se a altres tipus cel·lulars (Winter et al., 2003; Zuk et al., 2001). Un 10% de les cèl·lules de l'estroma vascular són macròfags CD14+ i CD31+ (Curat et al., 2004), la presència dels quals està assolint molta importància en els darrers anys per l'estreta relació establerta entre obesitat i inflamació. L'increment de la massa adiposa que caracteritza a l'obesitat està associat a profunds canvis histològics i bioquímics característics de l'estat inflamatori (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Diversos estudis en humans i rosegadors mostren que l'obesitat provoca un increment dels macròfags activats (cèl·lules multinucleades gegants), que són els principals secretors del factor de necrosi tumoral α (TNF α), la interleuquina 6 (IL-6) i citoquines que podrien ser les responsables del desenvolupament dels desordres associats a índexs de massa corporal elevats, com ara la diabetis tipus 2 i l'aterosclerosi, components de la síndrome metabòlica que també han estat associades amb la inflamació. De fet, tant el TNF α com la IL-6 estan directament correlacionades amb l'adipositat i la resistència a la insulina (Cottam et al., 2004).

Actualment, es coneixen fins a una cinquantena de molècules senyalitzadores secretades pel TAB de diferent naturalesa i funcions fisiològiques. Inicialment es van anomenar adipocitoquines totes aquelles molècules alliberades pel teixit adipós, doncs moltes d'elles eren de la família de les citoquines. Tot i que això és cert per algunes d'elles (TNF α i IL-6), s'ha optat per canviar el nom per adipoquines, de manera que inclou totes les molècules secretades pel TAB independentment de la seva naturalesa i funció (Trayhurn i Wood, 2004).

Contràriament al que es pensava fa uns anys, no tots els productes alliberats pel TAB son produïts pels adipòcits. Cada vegada hi ha més proves que els preadipòcits i les cèl·lules endotelials contribueixen en aquesta funció endocrina del TAB. A tall d'exemple es poden citar, l'inhibidor de l'activador del plasminogen 1 (PAI-1), que es sintetitza als preadipòcits (Crandall et al, 1999); o les proteïnes proinflamatòries, a la secreció de les quals hi contribueixen els macròfags (Weisberg et al, 2003) tal i com ja s'ha comentat abans.

Donat que la diversitat d'adipoquines és considerable (Figura 3), ens centrarem en aquelles que actualment es considera que tenen un paper més important en la regulació de la homeòstasi energètica.

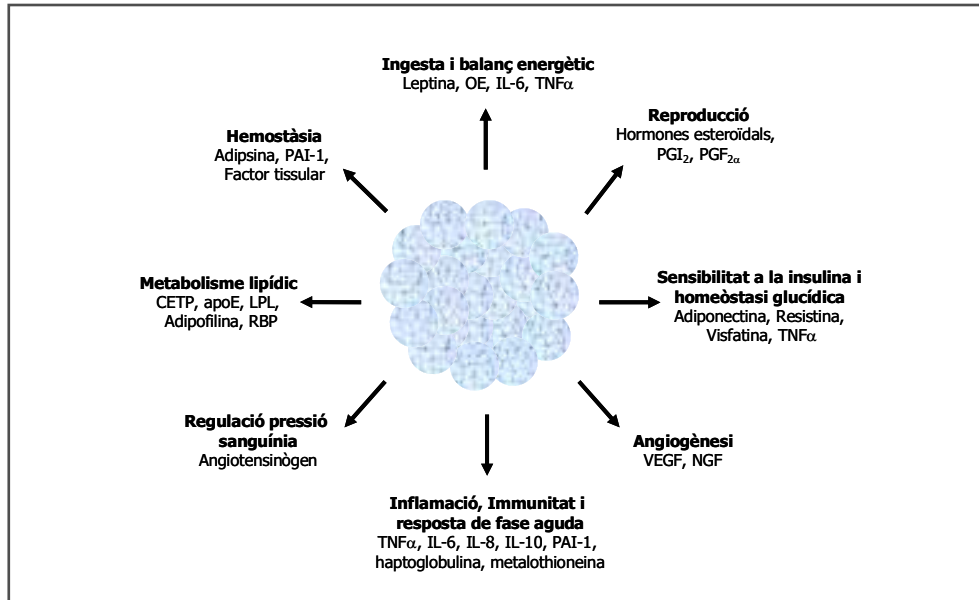


Figura 3. Funcions principals de les molècules secretades pel teixit adipós blanc. $TNF\alpha$: Factor de necrosi tumoral α , IL-6, IL-8, IL-10: Interleuquines 6, 8 i 10, PAI-1: Inhibidor de l'activador del plasminogen 1, RBP: Proteïna lligadora de retinol, CETP: Proteïna transferidora d'èsters de colesterol, VEGF: Factor de creixement endotelial vascular, NGF: Factor de creixement nerviós, apoE: Apolipoproteïna E, LPL: Lipoproteïna lipasa, PGI_2 i $PGF_{2\alpha}$: Prostaglandines I_2 i $F_{2\alpha}$ respectivament, OE: Oleoil-estrona. (Adaptació de Trayhurn i Wood, 2005).

1.3.1. LEPTINA

La leptina és una hormona produïda majoritàriament pel TAB que generalment es considera que juga un paper important en la regulació del balanç energètic, inhibint la ingesta i incrementant la despesa energètica. La leptina va ser identificada per Friedman i els seus col·laboradors l'any 1994 durant la caracterització del gen *Lep^{ob}* (Zhang et al., 1994), encara que experiments de parabiosi realitzats vàries dècades anteriors en els quals s'interconnectava la microcirculació del ratolí genèticament obès *ob/ob* (*Lep^{ob/ob}*) i un animal control ja feien intuir la presència d'un factor circulant aportat a través de la sang de l'animal prim que normalitzava parcialment el pes corporal del ratolí mutant (Hausberger, 1958). Un any després es va localitzar el gen que codifica pel seu receptor, el gen *Lep^{db}* (Tartaglia et al., 1995). Es va observar que els ratolins *db/db* (*Lep^{db/db}*), portadors d'una mutació al receptor de la leptina, a diferència dels ratolins *ob/ob* són insensibles a la leptina, i la seva administració no els produeix una pèrdua de pes corporal (Campfield et al., 1995).

Encara que el teixit adipós blanc n'és la font principal, la leptina també és produïda per altres teixits, com la placenta (Masuzaki et al., 1997), l'epiteli mamari (Casabiell et al., 1997) i l'estómac (Bado et al., 1998). Una de les primeres observacions que es va fer després del seu descobriment és que els nivells circulants de leptina estan relacionats amb el greix corporal i que d'alguna manera reflecteixen els nivells de massa grassa de l'organisme (Considine et al., 1996; Ostlund et al., 1996). A més, s'ha vist que existeix una correlació entre l'expressió del gen *Lep^{ob}* i el contingut lipídic dels adipòcits així com amb la seva mida (Maffei et al., 1995). Aquest fet, juntament amb la capacitat d'actuar sobre el nucli arquejat de l'hipotàlem i l'existència de receptors en aquest (Tartaglia et al., 1995) va fer que segons la teoria de Kennedy fos proposada com a senyal de lipostat (Zhang et al., 1994), teoria que no ha estat encara plenament confirmada.

Efectes de la leptina

La leptina, proposada com a senyal adipocitària, s'ha postulat que exerceix, juntament amb la insulina, un control a llarg termini de la ingesta (Schwartz et al. 2000). Canvis en l'estat energètic i l'adipositat es veuen reflectits en canvis en els nivells plasmàtics de leptina, davant dels quals els SNC respon ajustant la ingestió d'aliment per restablir la mida dels dipòsits de greix. En resposta al dejuni es produeix una marcada i ràpida reducció tant de la seva expressió com dels seus nivells circulants, canvis que reverteixen amb la realimentació (Trayhurn et al., 1995). Aquest descens agut dels nivells circulants de leptina durant curts períodes de dejuni o durant una restricció dietètica i independents de canvis en el contingut corporal de greix, sembla que poden protegir el balanç energètic ja des d'abans que els dipòsits de greix es vegin significativament disminuïts.

La leptina a nivell central actua com un potent factor de sadollament. La seva administració provoca un efecte inhibitori sobre la ingestió d'aliment, molt més marcat en els animals deficients en leptina que en els normals (Mercer et al., 1997); hi ha dades que indiquen que els efectes biològics de la leptina són més pronunciats quan els nivells circulants són baixos. Els pronunciats efectes de la leptina sobre la gana també han estat observats en obesos en els que s'ha identificat una mutació que incapacita el gen de la leptina (Montague et al., 1997); aquests individus presenten una reducció substancial de la gana i del greix quan se'ls administra leptina (Farooqi et al., 1999).

Els efectes a nivell del SNC de la leptina són possibles gràcies a l'expressió del seu receptor en els principals nuclis hipotalàmics reguladors de la gana (Elmqvist et al., 1998). Aquesta abundor de receptors permet la interacció de la leptina amb les principals vies tant orexigèniques com anorexigèniques (Ahima et al., 2000; Schwartz et al., 2000). Tant les neurones productores del NPY i l'AgRP, ambdós pèptids orexigènics, com les productores de POMC i CART, ambdós pèptids anorexigènics, expressen els receptors de la leptina (Cheung et al., 1997) i responen a l'hormona de manera oposada. L'administració de leptina redueix els

nivells del NPY als nuclis hipotalàmics ARC, PVN i DMH, reducció acompanyada per una ràpida disminució de la ingestió d'aliment i un increment de l'expressió de UCP-1 (Wang et al., 1997). La leptina també bloqueja els increments del NPY i de l'AgRP induïts pel dejuni (Ahima et al., 1996; Korner et al., 2001) igual que inhibeix la síntesi de la MCH i l'orexina A en l'hipotàlem lateral (Beck i Richy, 1999; Qu et al., 1996). En canvi, el sistema anorexigènic és estimulat per la leptina: l'administració de leptina incrementa l'expressió hipotalàmica de POMC (Schwartz et al., 1997), CART (Kristensen et al., 1998) i CRH (Ahima et al., 2000).

La leptina, a més d'actuar centralment a l'hipotàlem regulant la ingesta a llarg termini i l'homeòstasi energètica, també s'ha relacionat amb un control de la gana a curt termini modulant l'efectivitat de els senyals de sadollament (Woods i Seeley, 2000). La coadministració de CCK i leptina, en dosis baixes que per separat presentarien un efecte limitat, redueix significativament la ingestió d'aliment a curt termini i el pes corporal més a llarg termini (Matson et al., 1997; Matson et al., 2000).

La descripció de la producció de leptina per l'estómac ha obert noves expectatives a aquesta interacció entre els senyals d'adipositat i de sadollament (Cinti et al., 2000; Picó et al., 2003). La leptina exocrina secretada a la llum gàstrica en resposta a la ingestió d'aliment, podria participar, juntament amb altres pèptids gastrointestinals, com la CCK, en el control de la mida de la ingesta. La leptina produïda per l'estómac podria proporcionar informació ràpida al cervell modulant fibres vagals aferents que s'originen en les parets de l'estómac i l'intestí i finalitzen en el NTS (Yuan et al., 1999).

La leptina no només podria condicionar una reducció de la ingestió d'aliment, sinó també un augment de la despesa energètica, i en especial de la termogènesi a través de l'activació del sistema nerviós simpàtic i de l'eix hipotalàmic-hipofisari-tiroïdal. El ratolí *ob/ob* presenta un increment dels dipòsits de greix considerablement més gran que el de la soca salvatge quan tots dos són alimentats amb dieta de cafeteria, el que indica que la termogènesi induïda per la dieta igual que la induïda pel fred es veu substancialment reduïda en absència de la leptina (Trayhurn et al., 1982). En particular, la leptina potencia l'activitat simpàtica sobre el TAM (Collins et al., 1996; Haynes et al., 1997) i estimula l'expressió de les UCP tant al TAM com en altres teixits (Commins et al., 1999; Scarpace et al., 1997). La leptina també estimula l'expressió de l'hormona alliberadora de tirotròpina al nucli paraventricular, augment que es tradueix en un increment de les hormones tiroïdals, importants estimuladores de la despesa energètica (Harris et al., 2001). Diferents línies de recerca posen de manifest que el sistema de les melanocortines podria mitjançar, almenys en part, els efectes de la leptina sobre la despesa energètica (Chen et al., 2000; Elias et al., 1998; Satoh et al., 1998; Ste Marie et al., 2000).

Regulació de la producció de leptina

L'expressió i secreció de leptina està regulada per una gran varietat de factors. La insulina i els glucocorticoides estimulen la producció de leptina (Leroy et al., 1996; De Vos et al., 1995)

mentre que l'hormona del creixement la disminueix. L'expressió de la leptina s'incrementa per l'estradiol i disminueix per la testosterona (Baumgartner et al., 1999; Isidori et al., 2000), fet que podria ajudar a explicar la diferència en el contingut de leptina circulant entre gèneres (Havel et al., 1996).

L'impacte de la composició de la dieta sobre l'expressió de la leptina ha estat poc estudiat. Però, el consum de dietes riques en greix, que indueixen una menor secreció de insulina, es relaciona amb nivells de leptina més baixos (Havel et al., 1999), mentre que la glucosa estimula la seva producció i secreció (Havel, 1997).

Altres factors influeixen de manera directa l'expressió de leptina, com ara els agonistes del receptor de l'activador de la proliferació de peroxisomes γ (PPAR γ) i els agonistes β -adrenèrgics, que inhibeixen la seva producció, o el TNF α i la proteïna d'unió a l'element estimulador CCAAT α (C/EBP α) que la incrementen (Margetic et al., 2002).

1.3.2. ADIPONECTINA

L'adiponectina, també coneguda com Arp30 i AdipoQ ja que va ser caracteritzada simultàniament per diferents grups (Hu et al., 1996; Maeda et al., 1996; Scherer et al., 1995), és una adipoquina expressada en grans quantitats i de manera específica en adipòcits diferenciats. La seva expressió és més gran al teixit adipós blanc subcutani que al visceral (Fain et al., 2004). Al contrari que la leptina i altres adipoquines, l'expressió d'adiponectina i els seus nivells circulants estan inversament relacionats amb l'adipositat (Arita et al., 1999; Hotta et al., 2001). Els nivells d'adiponectina disminueixen amb l'obesitat, mentre que s'incrementen amb la pèrdua de pes induïda per la restricció calòrica (Arita et al., 1999; Hotta et al., 2001). Els nivells circulants d'adiponectina baixos s'han relacionat amb el desenvolupament de la síndrome metabòlica (Hotta et al., 2001); s'ha observat que una disminució dels nivells circulants d'adiponectina està relacionada amb una més gran resistència a la insulina (Hotta et al., 2001), hiperinsulinèmia (Weyer et al., 2001) i certes malalties coronàries (Kumada et al., 2003). L'administració d'adiponectina millora molts dels paràmetres metabòlics de l'obesitat o la lipodistròfia (Chandran et al., 2003; Diez i Iglesias, 2003; Kinlaw i Marsh, 2004).

Estudis més recents postulen una possible acció directa de l'adiponectina sobre la ingestió d'aliment i el control del pes corporal (Qi et al., 2004; Shklyayev et al., 2003). La seva administració perifèrica redueix el pes corporal a través de l'increment de l'oxidació d'àcids grassos i de la dissipació d'energia (Berg et al., 2001; Yamauchi et al., 2001; Tomas et al., 2002). L'expressió perifèrica mitjançant un vector viral inhibeix la gana i redueix el pes en rates amb obesitat induïda per la dieta, a més d'observar-se una millora en la sensibilitat a la insulina i una disminució dels nivells lipídics (Shklyayev et al., 2003). Sembla que aquests efectes de l'adiponectina podrien ser deguts a una actuació d'aquesta a nivell central, ja que s'ha vist que

pot travessar la barrera hematoencefàlica (Qi et al., 2004), a més de trobar-se dos tipus de receptors per l'adiponectina al SNC (Yamauchi et al., 2003).

L'adiponectina potencia els efectes centrals de la leptina, amb un increment de la termogènesi i de l'oxidació d'àcids grassos, i una reducció dels nivells de lípids i glucosa en el ratolí *ob/ob* (Qi et al., 2004). En canvi, el ratolí *agouti*, que no respon al tractament amb leptina, tampoc ho fa a l'adiponectina, el que pot indicar que el sistema de les melanocortines estigui implicat en els efectes centrals de l'adiponectina (Qi et al., 2004).

In vitro, l'expressió d'adiponectina està reprimida per factors que es troben incrementats en la resistència a la insulina, tals com el TNF α (Kappes i Löffler, 2000) i la IL-6 (Fasshauer et al., 2003), per glucocorticoides (Fasshauer et al., 2002) i agonistes β -adrenèrgics (Delporte et al., 2002). Pel contrari, el tractament amb tiazolidinacions (TZD), activadors farmacològics del PPAR γ , estimula l'expressió d'adiponectina, la qual cosa pot contribuir a la millora de la sensibilitat a la insulina (Pajvani et al., 2004).

1.3.3. FACTOR DE NECROSI TUMORAL α

El factor de necrosi tumoral α (TNF α) és una citoquina produïda en el TAB, majoritàriament pels macròfags infiltrats però també pels propis adipòcits, que va ser descrita inicialment per la seva capacitat de causar necrosi en tumors i d'induir caquèxia (Ghezzi i Cerami, 2005). La seva expressió varia en els diferents dipòsits adiposos, sent més gran en el TAB subcutani que en el visceral (Fain et al., 2004). Els triacilglicerols i els àcids grassos lliures són importants inductors de l'expressió de TNF α ; així, les dietes amb un elevat contingut lipídic incrementen significativament la seva expressió en els dipòsits adiposos (Morin et al., 1997). A més, el ratolí deficient en la proteïna lligadora d'àcids grassos (FABP4 o aP2) no expressa TNF α en els seus adipòcits (Hotamisligil et al., 1996) el que indica que els àcids grassos són crítics en la regulació de l'expressió adipocitària de TNF α . Altres reguladors de l'expressió de TNF α són les tiazolidinacions, les quals són potents inhibidors de la seva expressió.

El TNF α juga un paper important en l'obesitat i la resistència a la insulina. La seva expressió està incrementada en els obesos i manté una correlació positiva amb l'adipositat i la resistència a la insulina (Fernández-Real i Ricart, 2003; Hotamisligil et al., 1995;). El TNF α actua reduint el pes corporal com a conseqüència d'una substancial reducció de la massa del teixit adipós (Warne, 2003). El TNF α té un pronunciat efecte catabòlic sobre el TAB (Hube i Hauner, 1999), inhibint, entre d'altres, l'expressió de la lipoproteïna lipasa (LPL). S'ha descrit que el TNF α reprimeix l'expressió gènica de dos reguladors claus per a la diferenciació adipocitària, el factor de transcripció C/EBP α i el PPAR γ 2 (Stephens i Pekala, 1992; Xing et al., 1997). Aquesta supressió gènica provoca una desdiferenciació de la cèl·lula adiposa i la inhibició de l'adipogènesi per la subsegüent inhibició d'altres proteïnes adipocitàries controladores del metabolisme energètic, com la LPL, la FABP4, l'àcid gras sintetasa (FAS), l'acetil-CoA

carboxilasa (ACC), la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (GPDH) o el transportador de glucosa GLUT 4.

A més de les propietats antiadipogèniques del $TNF\alpha$ (Petruschke i Hauner, 1993), cal destacar que el $TNF\alpha$ podria contribuir a la pèrdua de massa adiposa per la inducció de l'apoptosi dels adipòcits (Prins et al., 1997; Qian et al., 2001; Zhang et al., 2001). També s'ha descrit un efecte inhibidor de la ingestió d'aliment quan el $TNF\alpha$ és administrat per infusió intracerebroventricular (Sonti et al., 1996), mentre que l'administració crònica perifèrica s'ha associat a una tolerància dels seus efectes anorèctics (Weingaten et al., 1992).

1.3.4. INTERLEUQUINA 6

La interleuquina 6 (IL-6) és una altre citoquina de producció adipocitària positivament correlacionada amb l'índex de massa corporal (Vgontzas et al., 1997). La seva producció és més gran al teixit adipós visceral que al subcutani (Fried et al., 1998) i s'ha vist que està modulada per glucocorticoides, catecolamines i $TNF\alpha$ (Fried et al., 1998; Grunfeld i Feingold, 1991; Papanicolaou et al., 1996). El $TNF\alpha$, la norepinefrina i els agonistes β 3-adrenèrgics estimulen tant la expressió com la secreció de IL-6, mentre que els glucocorticoides la inhibeixen.

Entre els seus efectes, la IL-6 indueix una pèrdua de pes i produeix resistència a la insulina en els adipòcits (Lagathu et al., 2003; Rotter et al., 2003). L'administració crònica intracerebroventricular de la IL-6 redueix la massa grassa mitjançant l'increment de la despesa energètica (Wallenius et al., 2002). La IL-6 incrementa la secreció hepàtica de triacilglicerols, el que podria contribuir a la hipertriacilglicerolemia associada a l'obesitat visceral (Nonogaki et al., 1995). S'ha observat que la IL-6 disminueix l'activitat LPL al teixit adipós, fet que s'ha relacionat amb el buidat dels dipòsits de greix durant la caquèxia lligada al càncer i altres malalties que cursen amb pèrdua de massa corporal (Greenberg et al., 1992; Strassmann et al., 1992). La neutralització de la IL-6 disminueix la pèrdua de teixit adipós durant la caquèxia.

1.3.5. RESISTINA

La resistina és una proteïna sintetitzada i secretada pels adipòcits madurs la qual s'ha postulat com el possible enllaç entre l'obesitat i el desenvolupament de la resistència a la insulina (Steppan et al., 2001). De fet, s'ha observat que els nivells circulants de resistina estan augmentats tant en models genètics com dietètics d'obesitat, i que el tractament amb tiazolidinacions els disminueix. S'ha demostrat tant *in vivo* com *in vitro*, que el tractament amb resistina disminueix la captació de glucosa estimulada per insulina, i indueix la resistència a la insulina, mentre que la immunoneutralització de la resistina té els efectes oposats (Steppan et al., 2001). Cal mencionar que estudis posteriors als de Steppan presenten resultats diferents, car mostren una forta disminució de l'expressió de la resistina al teixit adipós en l'obesitat i una

estimulació d'aquesta expressió pels agonistes del PPAR γ (Banerjee i Lazar, 2003; Way et al., 2001).

En estudis més recents realitzats amb ratolins deficients en resistina, s'observa que la seva absència provoca una millora de la tolerància a la glucosa quan són alimentats amb dieta hiperlipídica, sense que es vegi afectada la sensibilitat a la insulina. Aquesta millora s'ha associat amb una disminució de la gluconeogènesi hepàtica (Banerjee et al., 2004).

1.3.6. VISFATINA

La visfatina és produïda i secretada majoritàriament al teixit adipós visceral (Fukuhara et al., 2005). L'expressió i els nivells plasmàtics de la visfatina es veuen incrementats durant el desenvolupament de l'obesitat. La visfatina actua mimetitzant els efectes de la insulina: s'uneix i activa el receptor de la insulina, disminuint així els nivells de glucosa plasmàtics.

L'administració aguda de visfatina redueix significativament els nivells de glucosa en sang; efecte que és dosi-depenent i que no provoca canvis en els nivells plasmàtics d'insulina. Quan s'administra visfatina a ratolins obesos *KK4y* insulino-resistents o a ratolins diabètics (tractats amb estreptozotocina) els resultats són molt similars, confirmant que la seva actuació és independent de la insulina. Mentre que el ratolí deficient en visfatina (*visfatina*^{-/-}) no és viable i mor durant el desenvolupament embrionari, el ratolí *visfatina*^{+/-} presenta uns nivells de glucosa plasmàtics més alts en comparació al ratolí normal, tant en situació de dejuni com d'alimentació.

Igual que la insulina, la visfatina indueix l'acumulació de triacilglicerols en els preadipòcits en cultiu i accelera el procés d'adipogènesi per inducció de l'expressió de gens que codifiquen per marcadors adipocitaris (PPAR γ , C/EBP α , FAS, aP2) (Fukuhara et al., 2005).

1.4. ALTRES MECANISMES DE CONTROL DEL PES CORPORAL

En el control de la deposició de reserves cal destacar l'activa participació del sistema endocrí. Nombroses alteracions endocrines estan associades a canvis en el pes corporal que sumats a una predisposició genètica poden ser responsables del desenvolupament d'obesitat. Un increment en la secreció de cortisol i d'insulina o una caiguda en la secreció de l'hormona de creixement i andrògens o estrògens estan associats amb una disminució de la mobilització lipídica acompanyada d'un increment de la deposició grassa a l'organisme (Björntorp, 1995).

Aquests canvis hormonals s'han associat amb canvis més pronunciats de la deposició de greix visceral, probablement per la més important irrigació i l'abundor de receptors de glucocorticoides i andrògens al TAB visceral, que amplifiquen els efectes provocats per aquests desajustaments hormonals, contribuint al desenvolupament de la resistència a la insulina i l'aparició de la síndrome metabòlica.

1.4.1. INSULINA

La insulina va ser proposada per Woods i els seus col·laboradors ara fa més de tres dècades com el principal regulador de la ingestió d'aliment a llarg termini, del balanç energètic i de l'adipositat corporal (Woods et al., 1974). De fet, la insulina va ser el primer senyal d'adipositat proposat molt abans que la leptina (Schwartz et al., 1992; Woods i Seeley, 2001). Els nivells plasmàtics de la insulina es correlacionen directament amb l'adipositat corporal i la seva variació reflecteix canvis en l'estat energètic de l'organisme (Bagdade et al., 1967). En paral·lel, els nivells d'insulina circulants són afectats directament per la ingesta energètica recent; aquesta estimula la secreció pancreàtica d'insulina com a resultat de l'activació parasimpàtica del pàncrees, l'efecte directe dels nutrients, especialment la glucosa i els aminoàcids, i l'estimulació d'incretines gastrointestinals com el polipèptid insulinoatròpic dependent de glucosa (GIP) i el GLP-1 (D'Alessio et al., 2001).

La insulina, igual que la leptina, actua a nivell central reduint la gana, incrementant la despesa energètica i disminuint el pes corporal de manera dosi-depenent (Schwartz et al., 2000; Spiegelman i Flier, 2001). La seva administració intracerebroventricular redueix la hiperfàgia en models animals de diabetis, mentre que l'administració central d'anticossos antiinsulina o la supressió gènica dels receptors neuronals d'insulina provoca un augment de la ingestió d'aliment i un guany de pes (Schwartz et al., 2000; Sipols et al., 1995). Aquests efectes ens mostren el caràcter dual de la insulina, ja que per altre banda, aquesta és coneguda com la principal hormona anabòlica que promou l'emmagatzemament de reserves energètiques. La insulina potencia la captació de glucosa pels teixits (Czech, 1995), la preservació del greix i la lipogènesi (Müller et al., 1997).

Els receptors d'insulina es troben distribuïts per tot el cervell, amb una concentració més elevada en les àrees hipotalàmiques lligades a la regulació del balanç energètic. Així els efectes anorexigènics de la insulina impliquen interaccions amb diversos neuropèptids hipotalàmics reguladors del comportament alimentari, com ara el NPY i el sistema de les melanocortines (Schwartz et al., 2000). S'ha observat una colocalització dels receptors d'insulina i leptina (Elmqvist et al., 1998), fet que podria tenir una funcionalitat significativa. Fets com que la rata Zucker *fa/fa*, deficient en leptina, no redueixi la seva ingestió d'aliment ni el seu pes i que no s'alteri l'expressió del NPY respecte dels controls amb normopes quan se'ls administra insulina (Ikeda et al., 1986; Schwartz et al., 1992), o que el ratolí deficient en IRS-2, resistent a l'acció de la insulina, també presenti una resistència hipotalàmica a la leptina (Burks et al., 2000), o que la disrupció del receptor de la insulina al cervell provoqui hiperleptinèmia (Brüning et al., 2000), suggereixen que l'activitat central de la leptina seria crítica per a la senyalització de la insulina i que la resistència a la insulina està associada a una resistència en l'acció de la leptina a nivell central (Schwartz, 2000).

L'administració d'insulina inhibeix l'expressió del NPY i de l'AgRP mentre que activa el sistema hipotalàmic de les melanocortines per estimulació de l'expressió de la POMC en el nucli arquejat de l'hipotàlem, promovent una disminució de la gana i del pes corporal (Benoit et al., 2000).

1.4.2. HORMONES TIROÏDALS

L'acció moduladora de les hormones tiroïdals sobre el metabolisme basal i el seu efecte estimulador de la despesa energètica són coneguts des del 1895, any de la primera publicació en la que s'indicava el seu paper regulador de l'homeòstasi energètica (Levy, 1895). Les hormones tiroïdals són potents moduladors de la termogènesi adaptativa, del metabolisme lipídic i de l'estat cardiovascular, efectes que exerceixen a través de la unió i activació dels seus receptors nuclears, els quals actuen com a factors de transcripció. Així, la majoria dels efectes de les hormones tiroïdals són deguts a canvis en la transcripció gènica dels gens diana (Yen, 2001).

Les hormones tiroïdals augmenten la taxa metabòlica per increment de la respiració mitocondrial, activant la transcripció dels enzims de la cadena respiratòria i augmentant la densitat mitocondrial; per increment de la sensibilitat a les catecolamines i per estimulació de l'expressió de les UCPs entre d'altres (Grover et al., 2007). Els pacients amb hipotiroïdisme es caracteritzen per presentar sobrepès, degut a una baixa la taxa metabòlica, acompanyat de nivells elevats de colesterol i triacilglicerols plasmàtics; mentre que els pacients que presenten hipertiroïdisme són prims i tenen baixos nivells plasmàtics de colesterol.

La funció tiroïdal és normal en la majoria d'obesos, i no hi ha diferències significatives entre individus amb pes normal i sobrepès en els nivells de l'hormona alliberadora de tirotròpina, tirotròpina, tiroglobulina i T4; fins i tot és freqüent trobar un augment de la T3 en els individus obesos (Kokkoris i Pi-Sunyer, 2003). Aquests estudis postulen que l'augment de pes en d'hipotiroïdisme podria ser degut a una retenció d'aigua més que a un increment del greix corporal.

1.4.3. HORMONES ESTEROÏDALS

Moltes hormones esteroïdals tenen efectes sobre el pes corporal, especialment els glucocorticoides, implicats en el mecanisme de contrarregulació i protecció de la massa grassa (Björntorp, 1995). Els estrògens típics, com el β -estradiol, tenen un relatiu efecte aprimador i són activadors de la termogènesi (Dubuc, 1985; Lobo et al., 1993). Els andrògens contribueixen a la modificació de la distribució dels dipòsits de greix a l'organisme (Gray et al., 1979); la testosterona presenta una correlació inversa amb l'IMC (Barret-Connor i Khaw, 1988) i hi ha una associació entre obesitat i nivells baixos de testosterona total (Amatruda et al., 1978). La progesterona potencia l'acumulació de reserves grasses durant la gestació, i l'oleoil-estrona

(OE) provoca una marcada pèrdua de pes quan es administrada a animals d'experimentació (Sanchis et al., 1996).

Molts d'aquests efectes impliquen directament l'adipòcit (Cooke i Naaz, 2004), i és que el teixit adipós té una gran capacitat de síntesi d'estrògens (Simpson et al., 1989), degut a una elevada activitat aromatasa (Siiteri, 1987). El principal producte d'aquesta síntesi és l'estrona, que actua com a hormona potenciadora de l'acumulació de greix i del creixement (Remesar et al., 1999). La capacitat sintètica del TAB explicaria els alts nivells circulants d'estrona en els obesos (Feher et al., 1982; Brind et al., 1990).

Glucocorticoides

Els glucocorticoides són un element clau en el mecanisme de control del pes corporal (Björntorp, 1995). La seva funció comporta el manteniment dels nivells de substrats energètics, preservant la massa grassa i augmentant la disponibilitat de glucosa. Els glucocorticoides (el principal és el cortisol en humans i la corticosterona en rosegadors), es sintetitzen principalment a la glàndula adrenal, i la seva secreció està regulada per l'activitat de l'eix hipotàlem-hipòfisi-adrenal (HPA), sobre el qual els propis glucocorticoides exerceixen una retroalimentació negativa. També hi ha síntesi de glucocorticoides en altres teixits, on es dona la reconversió dels seus metabòlits inactius a hormona activa a través de l'enzim 11 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa de tipus 1 (11 β -HSD1). La secreció de glucocorticoides segueix un ritme circadià, i augmenta com a resposta a situacions d'estrès tant físic com psicològic (Grasa, 2004).

Els glucocorticoides són responsables d'accions metabòliques sovint antagòniques. A curt termini, disminueixen la ingestió d'aliment, inhibeixen la captació perifèrica de glucosa i la secreció de insulina, estimulen la gluconeogènesi i faciliten la lipòlisi. A mig i llarg termini, provoquen un augment de la gana a través de l'augment dels nivells del NPY i la disminució de la CRH, un augment del pes corporal, resistència a la insulina i hiperinsulinèmia, estimulants la lipogènesi sinèrgicament amb la insulina (Sapolsky et al., 2000).

Són moltes les dades experimentals i clíniques que associen els glucocorticoides i l'obesitat (Dunkelman et al., 1964). Els pacients tractats amb glucocorticoides presenten un increment de la ingestió d'aliment igual que qui pateixen la síndrome de Cushing, trastorn caracteritzat per l'hipercortisolèmia (Björntorp i Rosmond, 2000). Els glucocorticoides contrarregulen l'acció de la leptina; el tractament amb glucocorticoides produeix hiperleptinèmia i l'adrenalectomia causa un augment de la sensibilitat a l'efecte aprimador de la oleoil-estrona o la leptina, observacions que han fet postular que els glucocorticoides poden ser els responsables de la resistència a diverses hormones, com ara la insulina, l'oleoil-estrona o la leptina (Grasa et al., 1998b; Zakrewska et al., 1997). Hi ha una associació entre les disfuncions de l'eix HPA i l'obesitat central (Björntorp, 2000; 2001): el recanvi de cortisol està incrementat en els obesos, en els que s'han detectat alteracions del ritme circadià; l'excés o falta de resposta a l'estrès de la

secreció adrenal de cortisol s'ha associat a diferents graus d'obesitat i s'ha demostrat que en l'obesitat central masculina es perd la capacitat de retroalimentació negativa dels glucocorticoides sobre l'eix HPA (Jessop et al., 2001). També s'han trobat associacions entre l'obesitat i alteracions perifèriques relacionades amb l'acció glucocorticoide: l'activitat enzimàtica 11 β -HSD1 està incrementada en el teixit adipós dels obesos (Rask et al., 2001; 2002) igual que l'expressió dels receptors de glucocorticoides; una mutació en el gen de la globulina lligadora de corticosteroides (CBG) que produeix una proteïna amb menor afinitat pel cortisol i la meitat de la seva concentració habitual en sang dóna lloc a obesitat (Emptoz-Bonneton et al., 2000). També s'han descrit polimorfismes del receptor de glucocorticoides que estan correlacionats amb paràmetres que estan alterats en l'obesitat (Rosmond, 2002). Totes aquestes dades, juntament amb les coincidències entre la simptomatologia de la síndrome de Cushing i la síndrome metabòlica reforcen la idea que els glucocorticoides són un factor clau en el desenvolupament de l'obesitat, malgrat no tenir encara clara la resposta de si els glucocorticoides son la causa o una conseqüència d'aquesta (Friedman et al., 1996).

2. OBESITAT I SÍNDROME METABÒLICA

2.1. L'OBESITAT

L'obesitat es defineix com una acumulació patològica de reserves grasses a l'organisme. L'excés de reserves grasses, en especial les de tipus androide o visceral, constitueix un important factor de risc pel desenvolupament de complicacions metabòliques, cardiovasculars, respiratòries, articulars, psicològiques i immunitàries, així com per l'augment de la probabilitat en l'aparició d'alguns tipus de càncer (Taula 2), entitats nosocomials que contribueixen a afectar significativament la qualitat i esperança de vida del pacient obès (Salas-Salvadó et al., 2007).

Patologies associades a l'obesitat

- Malaltia Cardiovascular Ateroscleròtica
 - Cardiopatia isquèmica
 - Malaltia cerebrovascular
 - Arítmia
 - Altres alteracions cardiorespiratòries
 - Insuficiència cardíaca congestiva
 - Insuficiència ventilatòria
 - Síndrome d'apnees obstructives durant el son
 - Alteracions metabòliques
 - Resistència a la insulina i diabetis de tipus II
 - Hipertensió arterial
 - Dislipèmia aterògena
 - Hiperuricèmia
 - Digestives
 - Colelitiasi
 - Esteatosi hepàtica, esteatohepatitis no alcohòlica, cirrosi
 - Reflux gastroesofàgic, hèrnia de hiatus.
 - Musculoesquelètiques
 - Artrosi
 - Lesions articulars
 - Deformatats òssies
 - Altres complicacions
 - Insuficiència venosa perifèrica
 - Malaltia tromboembòlica
 - Càncer (dona: vesícula i vies biliars, mama i endometri a la postmenopausa; home: colon, recte i pròstata)
 - Hipertensió endocranial benigne
 - Alteracions cutànies
 - Alteracions psicològiques i psicosocials
 - Disfunció menstrual
 - Síndrome dels ovaris poliquístics
 - Infertilitat
 - Augment del risc perinatal
 - Incontinència urinària
 - Disminució de la qualitat de vida
 - Depressió
-

Taula 2. Patologies associades amb l'obesitat (adaptat de Salas-Salvadó, 2007).

Una persona és considerada obesa quan sobrepassa en més d'un 20% el límit màxim de greix corporal que li correspondria per a la seva edat, pes, sexe i estructura òssia. Avui en dia

s'ha generalitzat l'ús de l'Índex de Massa Corporal (IMC) o índex de Quetelet com a mesura del grau d'obesitat i de la seva gravetat (Garrow i Webster, 1985; Quetelet, 1969). Aquest índex, pensat per a estudis de poblacions i inadequat per a la seva aplicació a individus concrets, relaciona el pes corporal i l'alçada d'una persona [pes (kg)/alçada² (m²)], i proporciona una indicació aproximada de la composició de massa grassa de l'organisme, tot i que té les seves limitacions en ser aplicat de manera estricta. Com a índex d'obesitat no és directament aplicable a poblacions humanes que tenen diferències notables en alçada, com és el cas de nens i adolescents; ni en individus amb una elevada proporció de massa muscular, que tot i tenir un IMC propi d'un individu obès la quantitat de massa grassa que pugui tenir és mínima. Tampoc és aplicable a determinats grups ètnics amb formes corporals o alçades mitges significativament diferents a les del nucli leucoderm inicial amb el que l'índex va ser dissenyat (Fernández-López et al., 2005).

Una alternativa per l'estimació comparativa del grau d'obesitat seria l'índex de Rohrer o de forma corporal (IFC), el qual estableix una relació entre el pes i el volum d'una persona ($IFC=P/A^3$) i que teòricament no ha de patir desviacions sempre i quan es mantinguin les proporcions del cos sense canvis de forma. Aquest nou plantejament pot ser aplicat sense limitacions a nens, adolescents, individus d'ambdós sexes i diferents ètnies, però el seu ús no s'ha estès i a la pràctica presenta inconvenients similars als de l'IMC.

L'obesitat representa un dels més grans problemes de salut pública de la societat actual i en les últimes dècades la seva prevalença segueix un marcada corba ascendent, assolint proporcions epidèmiques. Segons últimes dades de l'Organització Mundial de la Salut, al 2005 hi havien en tot el món aproximadament 1600 milions d'adults amb sobrepès, dels quals, almenys 400 milions serien considerats clínicament obesos. Als Estats Units, estudis recents mostren que aproximadament el 65% dels adults estan per sobre del seu pes recomanable, dels quals, el 30% són obesos i al voltant del 5% presenten obesitat mòrbida.

A Europa, segons l'Associació Europea per l'Estudi de l'Obesitat, més d'un terç de la població pateix sobrepès i més d'una dècima part són clínicament obesos. Cada any uns 400.000 nens en edat escolar entren a la categoria de sobrepès. L'obesitat planteja un gran desafiament a la salut pública de la Unió Europea la qual s'ha mobilitzat, existint en l'actualitat més de vint projectes clínics destinats al seu estudi i eventual prevenció.

2.1.1. ETIOLOGIA DE L'OBESITAT

Sovint l'obesitat ha estat considerada com la conseqüència d'una excessiva disponibilitat alimentària amb un elevat contingut energètic (Poppitt, 1995; Rolls, 2000). Avui en dia, però, es reconeix la seva naturalesa multifactorial i s'entén l'obesitat com un procés patològic complex que reflecteix la interacció de factors genètics i ambientals.

Les bases genètiques de l'obesitat ja van ser posades de manifest fa anys en estudis realitzats amb bessons (Bouchard et al., 1990) o amb individus donats en adopció (Stunkard et al., 1986). Actualment, i gràcies a la tecnologia dels transgènics, es coneixen al voltant d'un centenar de gens implicats en el control de la homeòstasi energètica (Foster-Schubert i Cummings, 2006). Alteracions d'aquests gens en el context d'un ambient propici (abundor d'aliment) poden ser, segons molts autors, la causa primària del desenvolupament de l'obesitat (Palou et al., 2001). Malgrat tot, no es coneix l'explicació genètica de la susceptibilitat a l'obesitat de la gran majoria de pacients, i entre tots aquests gens, només 11 són tant vitals que la seva mutació és causa d'obesitat monogènica en els humans, havent estat identificats com a causants d'obesitat infantil greu. D'aquests gens, almenys set codifiquen proteïnes que pertanyen a la via de la leptina-melanocortines; la pròpia leptina, el receptor de la leptina, les proopiomelanocortines, la prohormona convertasa 1, els receptors de melanocortines 3 i 4 i el factor de transcripció SIM1 (Farooqi i O'Rahilly, 2006; Rankinen et al., 2005).

Alteracions metabòliques, dèficits hormonals, una conducta sedentària (Crawford, 1999), l'estrès (Parham, 1990), l'ús de determinats fàrmacs (Kroeze et al., 2003), o el fet de deixar de fumar (O'Hara et al., 1998) també poden contribuir al desenvolupament d'obesitat. En els últims anys s'han aportat noves dades sobre altres possibles causes de l'obesitat. D'una banda hi ha la possibilitat d'infecció per virus. Així, s'ha demostrat que l'adenovirus humà 36, quan s'inocula a pollastres i rates (Dhurandhar et al., 1997; 2000), provoca obesitat en aquest animals, fins i tot de manera diferencial a l'acció d'adenovirus específics per aquestes espècies. Més recentment, els mateixos investigadors han descrit que l'adenovirus 37 humà també incrementa l'adipositat i redueix els triacilglicerols circulants en models animals (Whigham et al., 2006). D'altra banda, cada cop hi ha més indicis de que les interaccions mare-fetus en les fases finals desenvolupament poden causar profundes modificacions en el pes corporal. Així, a partir de les dades de pes de ciutadans holandesos adults, les mares dels quals van patir fam quan estaven embarassades al final de la Segona Guerra Mundial, s'ha pogut determinar que els que van estar exposats a malnutrició en la primera meitat de la gestació presentaven una més gran incidència d'obesitat a l'edat adulta que no pas els fills de les mares que havien patit malnutrició en el darrer trimestre de gestació (Ravelli et al., 1976). A partir d'aquestes dades s'han realitzat molts experiments amb animals i molts estudis epidemiològics en humans, en els que s'ha demostrat convincentment que pertorbacions en el desenvolupament *in utero* poden influir permanentment en el canvi de les estructures d'òrgans, i alterar els mecanismes homeostàtics de les cries. Aquest fenomen denominat també "programació gestacional" pot condicionar, sense que encara es conegui el mecanisme, l'aparició de malalties com són l'obesitat, la diabetis i malalties cardiovasculars en al vida adulta (Ross i Desai, 2005).

Aquesta programació s'estén als primers anys del naixement. Mitjançant mecanismes ara mateix desconeguts, el fetus/nadó, ajusta el seu sistema de control del pes corporal (ponderostat), activant o no els gens estalviadors ("thrifty genotype" (Bouchard, 2007;

Schwartz i Niswender, 2004)) i, per tant, ajustant l'eficiència global de l'individu que durarà tota la seva vida. La gran disponibilitat actual d'aliment i l'estrès de la vida diària contrasten amb la selecció genètica i comporten un creixement de la incidència i gravetat de l'obesitat en paral·lel al desenvolupament econòmic i social de les poblacions humanes (Sørensen et al, 1989).

2.1.2. TRACTAMENT DE L'OBESITAT

Com s'ha comentat anteriorment, l'obesitat és el resultat d'un desequilibri sostingut del balanç energètic, pel que les estratègies emprades pel seu tractament estan basades en restablir l'equilibri amb la limitació de la ingesta o amb l'increment de la despesa energètica.

Canvis en l'estil de vida, dieta i exercici, combinats o no amb un tractament farmacològic, són ara mateix la base irrenunciable del tractament de l'obesitat (Katz, 2005; Li et al., 2005; Tsai i Wadden, 2005) malgrat tenir una eficàcia força limitada; normalment serveixen per a assolir una discreta reducció de pes a curt termini, tot i que els resultats a llarg termini tendeixen al fracàs. Cal recordar, que el sistema de control del pes corporal és altament complex i redundat, format per tota una sèrie de mecanismes compensatoris que seran activats en defensa d'un pes de referència davant de qualsevol intent de manipulació externa, i que aquests, probablement per selecció natural han evolucionat a favor de que la preservació de reserves suposa un avantatge biològic pels individus (Chakravarthy i Booth, 2004; Schwartz i Niswender, 2004). L'individu obès, que té un nivell de referència de greix corporal alt (ajustament alt del ponderostat) (King, 1976), també disposa dels mecanismes compensatoris que eviten canvis en la quantitat de massa grassa quan s'intenta manipular el sistema de manera externa, ja sigui mitjançant la restricció de la ingesta energètica o per increment de la despesa (Major et al., 2007). Aquest fet, juntament amb l'acció contrarreguladora que exerceixen els corticosteroides, explicarien la manca d'efecte terapèutic de moltes estratègies contra l'obesitat (Fernández-López et al., 2002).

En aquest apartat, no podem oblidar la cirurgia bariàtrica, la qual és la més eficaç (i perillosa) de les estratègies terapèutiques pel tractament de l'obesitat, però que només queda reservada per a pacients amb obesitat mòrbida, que pateixen complicacions importants i en els que la resta de teràpies han fracassat. Malgrat la seva eficàcia amb pronunciades reduccions de pes, és un procediment molt invasiu que comporta tota una sèrie de complicacions postoperatòries i no sempre genera els resultats esperats a canvi de profunds canvis funcionals, de comportament i metabòlics a llarg termini (Wolfe i Morton, 2005).

APROXIMACIONS PEL TRACTAMENT DE L'OBESITAT

Acció sobre la disponibilitat energètica

- Restricció calòrica mitjançant dieta: Diètes hipocalòriques, hiperproteïques, cetogèniques
- Cirurgia bariàtrica
- Tractament farmacològic
 - Controladors de la ingestió d'aliment (modificadors de la gana i sadollament)
 - Agents adrenèrgics: fentermina, mazindol
 - Agents serotoninèrgics: fenfluramina, sertralina, fluxetina
 - Agents adrenèrgics i serotoninèrgics: sibutramina
 - Antagonistes dels receptors de cannabinoides: rimonabant
 - Pèptids hipotalàmics: agonistes de l' α MSH, antagonistes del receptor del NPY i del receptor de la MCH
 - Pèptids intestinals: anàlegs del GLP-1, de la CCK, del PYY₃₋₃₆ o antagonistes de la ghrelina
 - Altres agents modificadors de la ingestió d'aliment:
 - Antagonistes dels receptors de histamina
 - Antagonistes opioides
 - Antiepilèptics: Topiramata i zonisamida
 - Leptina
 - Factor neurotròfic ciliar: Axokine
 - Oleoïl-estrona
 - Modificadors de la disponibilitat i absorció de nutrients
 - Substitutius hipocalòrics o acalòrics: edulcorants, olestra
 - Modificadors de l'absorció de nutrients: Fibra
 - Inhibidors d'enzims digestius: acarbosa, orlistat

Acció sobre la despesa energètica

- Exercici
- Fred
- Fàrmacs termogènics
 - Agents adrenèrgics: agonistes dels receptors β 3, efedrina, efedrina-cafeïna
 - Hormones tiroïdals

Altres aproximacions farmacològiques

- Anàlegs de l'hormona de creixement: AOD9604
- Modulació de la plasticitat sinàptica: axokine
- Moduladors del metabolisme lipídic: carnitina, agonistes PPAR α , agonistes PPAR β , antagonistes PPAR γ
- Accions sobre el TAB:
 - Anticossos
 - Inhibidors metabòlics
 - Bloquejadors de la diferenciació del TAB

Taula 3. Aproximacions pel tractament de l'obesitat.

El tractament farmacològic està indicat per a pacients amb un IMC > 30, o per pacients amb sobrepès (IMC > 27) sols quan presentin comorbilitats com la diabetis mellitus, hipertensió arterial o dislipèmies (Pereira i Astorga, 2005). Els fàrmacs actualment al mercat mai no han de ser utilitzats com a tractament aïllat, sinó com a opció complementària de teràpies bàsiques com la dieta hipocalòrica, l'exercici i el canvi d'estil de vida. Els criteris d'avaluació de l'eficiència d'un nou fàrmac són variats, com a primer objectiu ha d'aconseguir una pèrdua de pes del 5%-10% respecte el pes inicial en un període de 6 a 12 mesos i que aquesta es pugui mantenir a llarg termini. Un segon objectiu seria la disminució dels factors de risc cardiovascular associats (Ioannides-Demos et al., 2005).

La tecnologia dels transgènics, que ha permès millorar els nostres coneixements de la regulació del balanç energètic i de les bases biològiques de l'obesitat, aporta cada dia noves i potencials dianes terapèutiques per l'obesitat. El coneixement del mecanisme d'acció d'hormones com la insulina i pèptids com la leptina o la ghrelina, i dels diferents neuropèptids implicats en el control dels sistemes de gana i sadollament, així com d'altres noves molècules de síntesi amb activitat termogènica i lipolítica, constitueixen un nou i prometedor camp de investigació que pot ajudar a augmentar el nombre d'armes terapèutiques amb les que fer front a l'obesitat. Malgrat això, hores d'ara el nombre de fàrmacs disponibles pel tractament de l'obesitat continua sent extremadament limitat en comparació amb els existents pel tractament d'altres malalties multifactorials. Molts fàrmacs han demostrat una reducció significativa del pes a curt termini respecte dels controls (≤ 1 any), però la seva eficàcia a llarg termini no ha estat demostrada. Actualment només són tres els fàrmacs autoritzats per l'Agència Europea del Medicament pel tractament de l'obesitat: la sibutramina, l'orlistat, i molt recentment el rimonabant.

2.1.2.1. FÀRMACS QUE ACTUEN SOBRE LA DISPONIBILITAT ENERGÈTICA

Actualment, el nombre d'estratègies terapèutiques amb la finalitat de controlar la disponibilitat energètica és força considerable ja que gran part de les investigacions s'han concentrat en aquest camp. El desenvolupament d'aliment hipocalòrics, molècules que retarden el buidat gàstric, reductors de l'absorció intestinal o inhibidors d'enzims claus en la digestió dels nutrients són algunes de les estratègies més emprades per limitar la disponibilitat de nutrients a l'organisme. Però sens dubte, les principals investigacions es centren en els mecanismes de control de la gana i la ingestió d'aliment. Seguint dos tipus d'estratègies s'han desenvolupat per una banda, i mitjançant estudis farmacològics clàssics, modificadors de les respostes adrenèrgica, serotoninèrgica i d'altres neurotransmissors implicats en el control de la gana; i per un altre, i mitjançant estudis moleculars, agonistes o antagonistes dels receptors dels principals pèptids reguladors de la ingestió d'aliment a nivell hipotalàmic i gastrointestinal.

2.1.2.1.1. FÀRMACS QUE MODIFIQUEN LA INGESTIÓ D'ALIMENT

2.1.2.1.1.1. AGENTS ADRENÈRGICS

Amfetamines i anàlegs

Les amfetamines van ser utilitzades els anys 60 com el primer tractament farmacològic per a l'obesitat. Aquestes i els seus anàlegs són agents simpatomimètics indirectes que incrementen l'alliberament de noradrenalina de les vesícules presinàptiques a l'hipotàlem lateral, augmentant l'estimulació dels receptors β_2 -adrenèrgics i inhibint d'aquesta manera la gana (Carlsson, 1970; Caul et al., 1988; Jones et al., 1992) Posteriorment, es va observar que les amfetamines també bloquegen la recaptació de dopamina reforçant la supressió de la gana però també potenciant

el seus efectes addictius (Ioannides-Demos et al., 2005). Malgrat que han estat àmpliament utilitzades en el tractament de l'obesitat durant molts anys, l'aparició de greus efectes secundaris lligats al seu efecte estimulants del sistema nerviós central (eufòria, ansietat, quadres psicòtics, addicció) i la ràpida pèrdua d'eficiència en el tractament continuat han fet que s'hagi restringit totalment el seu us en els països occidentals.

A partir de l'amfetamina, s'han desenvolupat anàlegs de similar potència anorexigènica, però amb propietats simpaticomimètiques i estimulants menys marcades. Entre ells destaquen: la fentermina, el dietilpropió, la fendimetracina i la benzfetamina. La utilització de tots ells està aprovada per la FDA només per tractaments curts de menys de 12 setmanes (Yanovski i Yanovski, 2002), però no per l'Agència Europea del Medicament. Tots ells inclouen com efectes secundaris insomni, sequedat de boca, hipertensió, palpitations, irritabilitat i nerviosisme.

La **fentermina**, a més de ser un agent simpatomimètic, presenta també un efecte inhibitor de la monoamino oxidasa (MAO), enzim responsable de la degradació de la serotonina perllongant l'acció d'aquesta última (Maher et al., 1999; Ulus et al., 2000). La seva combinació amb fenfluramina produeix unes pèrdues de pes al voltant del 15%, però estudis posteriors han demostrat que aquesta combinació està associada a l'aparició de valvulopaties i hipertensió pulmonar. Actualment s'estan realitzant estudis combinant la fentermina amb la fluoxetina en les que les pèrdues de pes no són tant efectives però que –de moment– no es troben associades a lesions cardíques (Whigham et al., 2006).

Mazindol

El mazindol és un agent adrenèrgic que a diferència de l'amfetamina i els seus anàlegs perllonga l'estimulació adrenèrgica bloquejant la recaptació de noradrenalina a nivell presinàptic (Hadler, 1990). El mazindol indueix la típica estimulació adrenèrgica però sense crear addicció.

2.1.2.1.1.2. AGENTS SEROTONÈRGICS

L'observació que els nivells sinàptics de serotonina en determinades àrees cerebrals influeixen en el comportament i l'estat anímic (Leonardo, 1996) va portar al desenvolupament d'un grup de fàrmacs que, a través del manteniment d'aquests nivells, són d'aplicació clínica en el tractament de la depressió. Durant la seva utilització clínica es van observar els seus efectes supressors de la gana i la secundària pèrdua de pes, el que va ampliar les seves indicacions al tractament farmacològic de l'obesitat.

Fluoxetina

La fluoxetina és un inhibidor selectiu de la recaptació de serotonina que augmenta l'activitat serotoninèrgica. Aquest producte no va ser aprovat específicament per a la pèrdua de pes, sinó com a antidepressiu, essent un dels fàrmacs més utilitzats. Malgrat la seva limitada eficàcia és un dels fàrmacs més emprats pel tractament de l'obesitat (Levine et al., 1987).

La fluoxetina redueix la gana i la ingestió d'aliment en individus obesos conduint a una pèrdua inicial de pes (Newton et al., 1995), que no continua al llarg del tractament. En molts estudis, ja es comencen a observar recuperacions en el pes a la meitat del tractament i la seva eficàcia més enllà de les primeres 28 setmanes de tractament és dubtosa (Goldstein et al., 1994).

Sertralina

La sertralina és un altre inhibidor selectiu de la recaptació de serotonina que ha estat avaluat com a fàrmac facilitador del manteniment del pes com a continuació dels tractaments amb dietes de molt baix contingut calòric (Wadden et al., 1995). La seva eficàcia a llarg termini, com en el cas de la fluoxetina, encara no s'ha pogut demostrar.

Bupropion

El bupropion és un altre antidepressiu, i d'ús actual pel tractament del tabaquisme, que potencia la sensació de sadollament per inhibició de la recaptació de noradrenalina i dopamina (Jain et al., 2002). El bupropion també presenta un efecte termogènic mediat per l'activació del receptor de dopamina D₂ i del receptor β_3 -adrenèrgic (Zarrindast i Abolfathi-Araghi, 1992). Actualment, un dels seus metabòlits, la radafaxina, un feble inhibidor de la recaptació amb capacitat de bloqueig dels transportadors de dopamina i noradrenalina, està sota desenvolupament clínic com a potencial fàrmac antiobesitat (GlaxoSmithKline, 2004).

Fenfluramina i dexfenfluramina

La fenfluramina i la seva forma activa, l'isòmer d, o dexfenfluramina, augmenten els nivells sinàptics de serotonina per estimulació del seu alliberament o per inhibició de la seva recaptació, estimulants a nivell hipotalàmic el centre de control del sadollament (Davis i Faulds, 1996). El seu potent efecte anorexigènic, com el d'altres fàrmacs antidepressius d'aquest grup, va modificar ràpidament la seva indicació principal.

La seva associació amb fàrmacs adrenèrgics com la fentermina presentava no només un augment de la seva eficàcia sinó que disminuïa els requeriments de cada fàrmac, donant lloc a una disminució d'efectes secundaris i una millor tolerància per part del pacient. Per aquesta raó aquests fàrmacs, en prescripció única o en combinació, van ser emprats àmpliament en el tractament de l'obesitat fins que l'evidència dels greus efectes secundaris que produïa van justificar la seva retirada del mercat farmacèutic l'any 1997. L'any 1996, un estudi clínic molt ampli va permetre establir l'associació entre el tractament amb fenfluramina i la hipertensió arterial primària (Abenhaim et al., 1996). Posteriorment, al 1997, van ser descrits 24 casos de lesió valvular en pacients tractats amb fenfluramina-fentermina (Connolly et al., 1997; Li et al., 1999). Sembla que la interferència d'aquests fàrmacs sobre els nivells circulants de serotonina pot ser la base d'aquests efectes secundaris.

Agonistes dels receptors serotoninèrgics

En l'actualitat es troben en desenvolupament diversos agonistes del receptor serotoninèrgic 5-HT_{2C}. En els estudis realitzats amb ratolins *knockouts* per aquest receptor, el presenten com el receptor mediador dels efectes anorèctics de la serotonina; en aquests ratolins s'observa un increment del pes i de la deposició de greix associats a un comportament hiperfàgic (Nonogaki et al., 1998; Tecott et al., 1995). En un principi, i malgrat els efectes reductors de la ingesta i del pes corporal tant en rosegadors com en humans (Halford, 2005), el desenvolupament de molts agonistes serotoninèrgics no ha continuat finalment per la seva afinitat respecte dels receptors 5-HT_{2A} i 5-HT_{2B}, responsables, respectivament, d'al·lucinacions i valvulopaties cardíques.

Més recentment, s'han desenvolupat agonistes selectius del receptors 5-HT_{2C} (Das i Chakrabarti, 2006). Un bon exemple és l'APD-356 o lorcaserina, que ha presentat una bona eficàcia i un bon perfil de seguretat en els assajos clínics de fase II i amb el que s'acaben d'iniciar els estudis de fase III (Smith et al., 2006). En rosegadors s'ha vist que inhibeix el desenvolupament de l'obesitat induïda per la dieta i que el seu efecte està associat a una fase inicial d'hipofàgia (Bjennig et al., 2004).

En estudis molt recents, tant el receptor serotoninèrgic 5-HT₆ com el 5-HT_{1B} també s'han relacionat amb el control de la ingestió d'aliment. El receptor 5-HT₆ està present a nivell del SNC lligat als sistemes de recompensa, i s'ha identificat com una nova diana per al tractament de l'obesitat. Un antagonista selectiu per a aquest receptor, el BVT 74316, està en la fase I dels assajos clínics (Biovitrum, 2006). Per altra banda, l'activació del receptor 5-HT_{1B}, amb un agonista com el sumatriptan (Boeles et al., 1997), estimula indirectament les neurones productores de POMC, complementant l'acció del receptor 5-HT_{2C} activat per serotonina o agents serotoninèrgics (Heisler, 2006). Així, un agonista combinat dels dos receptors augmentaria molt més l'estimulació catabòlica de la via de les melanocortines, provocant probablement una pèrdua de pes més marcada.

2.1.2.1.1.3. AGENTS D'ACCIÓ COMBINADA: ADRENÈRGICS I SEROTONÈRGICS

Sibutramina

La recerca d'una nova família de fàrmacs que combinés els efectes serotoninèrgics i adrenèrgics de forma similar a la combinació fenfluramina-fentermina en un únic fàrmac, va portar a la síntesi d'una amina terciària, la sibutramina. La sibutramina, comercialitzada amb els noms de Meridia[®] o Reductil[®], i que originàriament també va ser desenvolupada com a antidepressiu, és un dels dos fàrmacs autoritzats actualment a Europa pel tractament continuat de la obesitat en adults des del 1999. La seva eficàcia a llarg termini ha estat estudiada en diferents estudis clínics d'un i dos anys de durada (Corner i Aronne, 2004; James et al., 2000). La sibutramina és un inhibidor de la recaptació de la serotonina, de la noradrenalina i en menor

grau de la dopamina (Heal et al., 1998), que provoca un estímul perllongat sobre el centre de control del sadollament, disminuint la gana i generant de forma paral·lela un lleuger augment en la despesa energètica, característicament disminuïda durant la pèrdua de pes com a mecanisme compensatori.

La sibutramina produeix una pèrdua de pes significativa, de manera dosi-depenent i amb una bona tolerància amb les dosis habituals de 10-20 mg diaris (Bray et al., 1999; Hanotin et al., 1998). Les pèrdues de pes durant el tractament crònic amb sibutramina es presenten durant els sis primers mesos; posteriorment el tractament ajuda a mantenir les pèrdues aconseguides (Arterburn et al., 2004). Juntament amb la pèrdua de pes, el tractament amb sibutramina millora les corbes de tolerància a la glucosa, els nivells d'àcid úric i el perfil lipídic del pacient. S'observa una disminució dels nivells plasmàtics de colesterol LDL, colesterol total i triacilglicerols i un augment del colesterol HDL (Fujioka et al., 2000; Gokcel et al., 2001). L'eficàcia de la sibutramina, però, és limitada, car la pèrdua global és relativament petita, és depenent de la utilització de dietes hipocalòriques, no és eficient pel tractament dels obesos mòrbids i hi ha una significativa proporció de persones "no-responedors" als quals la sibutramina no els fa cap efecte. Malgrat aquesta demostrada manca d'eficàcia és en la pràctica l'únic producte disponible amb un cert grau de seguretat pel tractament indefinit de l'obesitat.

A diferència de la fenfluramina i la dexfenfluramina, la sibutramina no indueix l'alliberament de serotonina i no s'ha descrit la seva associació a valvulopaties (García-Luna et al., 2002; Pereira et al., 2002). Entre els efectes adversos més comuns que es presenten cal destacar l'augment de la pressió arterial, sistòlica i diastòlica, i de la freqüència cardíaca en un 5-10% dels pacients (Padwal et al., 2003), sent aconsellable monitoritzar la pressió arterial i la freqüència cardíaca a tot pacient en tractament amb sibutramina i es desaconsella la seva utilització en pacients amb hipertensió arterial no controlada i/o cardiopatia isquèmica crònica (Weigle, 2003). Altres efectes associats són la sequedat de boca, nàusea, estrenyiment, cefalea, insomni i alguns casos de psicosi (Padwal et al., 2003).

2.1.2.1.1.4. ANTAGONISTES DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES

Rimonabant

De tots els antagonistes dels receptors de cannabinoides CB₁ que s'estan desenvolupant actualment, el rimonabant, SR-141716 o Acomplia[®], n'és el màxim representant. El rimonabant és un antagonista selectiu del receptor CB₁ que acaba de ser aprovat per la Unió Europea per al tractament de l'obesitat. Els estudis preclínic indiquen que el rimonabant redueix la ingestió d'aliment per modificació de la sensació de sadollament (Thornton-Jones et al., 2005). Aquesta modificació es deguda al bloqueig dels receptors CB₁, receptors estimuladors de la gana (Kirkham, 2005) que es troben àmpliament distribuïts per tot el SNC i que són especialment abundants a l'hipotàlem. També es troben expressats al tracte gastrointestinal, el fetge i el

teixit adipós (Raynor et al., 2006), llocs crítics de la regulació energètica; el que indica que l'acció del rimonabant es produeix tant a nivell central com perifèric.

En animals d'experimentació, el rimonabant a més del seu efecte reductor de la ingestió d'aliment i del pes corporal, també inhibeix directament la lipogènesi en el TAB, disminueix l'adipositat, estimula la síntesi d'adiponectina, redueix l'expressió de la proteïna C-reactiva, estimula la captació de glucosa per part del múscul per un augment de la sensibilitat a la insulina, redueix l'esteatosi i millora la dislipèmia (Pagotto et al., 2006).

El rimonabant produeix una reducció de la ingesta, de la gana i del pes corporal tant en pacients amb sobrepès com en pacients obesos després de 7 dies de tractament (Heshmati et al., 2001). També s'observa una millora dels perfils lipídic i glucèmic. Els estudis clínics a llarg termini presenten pèrdues de pes molt moderades i una millora dels factors de risc cardiometabòlic (Ioannides-Demos, 2005; Pi-Sunyer et al., 2006), probablement atribuïbles a la pèrdua de pes i als efectes perifèrics del fàrmac. El rimonabant presenta bona tolerància, encara que en un considerable percentatge de pacients s'ha associat a l'aparició de nàusea, diarrea, vertigen i ansietat, que incrementen d'una manera dosi-depenent (Després et al., 2005; Powell, 2006). Per una altra banda, recentment ha estat necessari l'inici d'un estudi (STRADIVARIUS) per clarificar els efectes del rimonabant en el desenvolupament de l'aterosclerosi coronària, ja que s'ha vist que el bloqueig dels receptors CB₁ té efectes perjudicials en models animals d'isquèmia miocàrdica (Wagner et al., 2001) i que en models animals de hipertensió provoca un increment de la pressió sanguínia (Batkai et al., 2004). Molt recentment, la FDA ha plantejat la no aprovació de l'ús del producte pel tractament de l'obesitat per induir depressió intensa que ha pogut derivar en suïcidis. La baixa eficàcia real combinada amb aquests negatius efectes secundaris plantegen dificultats insuperables per la comercialització del producte i el seu ús continuat.

No obstant això, l'èxit inicial del rimonabant ha animat a que moltes companyies farmacèutiques hagin iniciat programes de desenvolupament d'altres antagonistes CB₁ (Das i Chakrabarti, 2006); com ara el V24343, que es troba en fase clínica I; el SLV-319, SR147778 i AVE-1625, que estan en fase II; o el MK-0364 i el CP-945,598, que ja es troben en fase III (Aronne i Thornton-Jones, 2007).

2.1.2.1.1.5. PÈPTIDS HIPOTÀLAMICS

Agonistes dels receptors de les melanocortines

El fet de que deficiències a qualsevol nivell de la via de les melanocortines estiguin associades a un increment de la gana i una disminució de la despesa energètica i siguin la causa més comuna d'obesitat monogènica tant en rosegadors com en humans (O'Rahilly et al., 2004), ha potenciat l'interès d'aquest sistema com a diana terapèutica pel tractament de l'obesitat.

Desafortunadament, l'èxit en el desenvolupament d'agonistes pels receptors de les melanocortines no ha estat l'esperat, ja que els receptors MC4 hipotalàmics no només participen en el control de la homeòstasi energètica, sinó que la seva activació provoca un increment de la pressió sanguínia, del ritme cardíac (Kuo et al., 2003; Nordheim et al., 2006) i de les ereccions (Wessels et al., 2005). D'aquesta manera, un dels agonistes desenvolupats fins aleshores, el PT-141, està indicat en l'actualitat pel tractament de la disfunció sexual més que pel de l'obesitat (Diamond et al., 2004).

Antagonistes del receptor de la MCH

La MCH és un pèptid orexigènic amb un paper molt important en la regulació central del balanç energètic i del pes corporal a través dels receptors MCH-1 (Qu et al., 1996). Aquest fet ha motivat a diferents companyies farmacèutiques al desenvolupament de diferents antagonistes d'aquest receptor com a potencials teràpies contra l'obesitat, Alguns exemples són: T-226296, SNAP-7941, ATC-0175, GW-803430, GW- 856464 o AMG-076 (Das i Chakrabarti, 2006).

Antagonistes dels receptors del NPY

El NPY és un potent estimulant central de la gana (Dube et al., 1994; Gehlert, 1999). Els receptors de NPY identificats són múltiples, però estudis realitzats amb ratolins *knockouts* suggereixen que els seus efectes sobre la ingestió d'aliment són mediats a través dels receptors Y1 i Y5 (Das i Chakrabarti, 2006; Wieland et al., 2000). Els ratolins deficients en el receptor Y1 manifesten una marcada hipofàgia que curiosament només està associada a una pèrdua de pes en aquells que a més presenten un defecte en el funcionament de la leptina (Erickson et al., 1996). Aquest mateix comportament també es dona en la rata, on la supressió de la gana va acompanyada d'una pèrdua de pes únicament en la soca Zucker *fa/fa* (Ishihara et al., 2002). L'administració d'antagonistes selectius dels receptors Y1, com ara el J-104870 mimetitzen tots aquests efectes, el que fa pensar que el seu potencial ús terapèutic sols seria possible en individus amb un sistema de la leptina deficient.

En canvi, l'acció a través dels receptors Y5 sembla ser independent de la leptina. Exemples d'antagonistes d'aquests receptors són: S-2367, que provoca una lleugera pèrdua de pes en pacients obesos (www.shionogi.co.jp), o MK-0577, que recentment ha estat descartat després d'un any en estudis clínics de fase 2 degut a manca real d'eficàcia (Enrondo et al., 2006).

2.1.2.1.1.6. PÈPTIDS GASTROINTESTINALS

Els senyals generats en el tracte gastrointestinal com a conseqüència de l'arribada d'aliments aporten al cervell una acurada i efectiva informació que provoca l'aturada de la ingestió d'aliment. Això ha induït a moltes companyies farmacèutiques a centrar les seves investigacions en la recerca d'estratègies terapèutiques basades en mimetitzar aquests senyals pre- i post-

absortius per tal de reduir la quantitat de menjar ingerit i promoure el sadollament postprandial (Halford et al., 2004).

Anàlegs del GLP-1

El GLP-1 és un pèptid intestinal alliberat en resposta a la ingestió d'aliment de nutrients amb múltiples funcions: estimula la biosíntesi i secreció de insulina glucosa-depenent, estimula l'expressió del transportador de glucosa GLUT 2 i la glucoquinasa, redueix la secreció de glucagó, retarda el buidament gàstric i redueix el pes corporal (Rondinone, 2005). Aquestes múltiples funcions van fer incrementar l'interès de moltes empreses farmacèutiques en la recerca de molècules capaces de mimetitzar aquests efectes.

Els primers agents basats en el GLP-1 com a diana es van desenvolupar pel tractament de la diabetis de tipus 2. En aquests pacients es va observar una reducció de la gana i una moderada pèrdua de pes.

Actualment, alguns dels anàlegs del GLP-1 que es troben en desenvolupament són: l'exenatida, l'exenatida-LAR, la PC-DAC:Exendina-4 i la liraglutida (Das i Chakrabarti, 2006). L'exenatida està actualment comercialitzada pel tractament de la diabetis, però en els estudis clínics ja es va associar a una modesta, però progressiva, pèrdua de pes que persistia durant els dos anys de tractament (Henry et al., 2006). Aquesta característica ha fet que l'exenatida es diferenciï dels altres agents utilitzats pel control glucèmic que típicament promouen un guany de pes. Un problema freqüent d'aquests compostos és el que produeixen nàusea i que no poden ser administrats a pacients amb valors normals de glucèmia (Halford, 2006).

Anàlegs del PYY₃₋₃₆

El PYY₃₋₃₆, forma activa del PYY, alliberat per la mucosa intestinal en resposta a la ingestió d'aliments, és també objecte d'investigació de moltes empreses farmacèutiques. Actualment, l'AC-162352, un anàleg sintètic del PYY₃₋₃₆ humà es troba en la fase I dels assajos clínics; aquest pèptid redueix la gana i incrementa la sensació de sadollament en els pacients obesos (Lush et al., 2005). Un inconvenient d'aquest compost és, que a l'igual que altres anàlegs de pèptids intestinals, indueix nàusea després de l'administració, fet que la seva possible aplicació.

Agonistes de la CCK

El sistema de la CCK ha estat diana d'un elevat nombre de fàrmacs antiobesitat potencials ja que la CCK és considerada com un factor clau en la inducció de sadollament (Silver i Morley, 1991). Malgrat els nombrosos agonistes sintètics i semisintètics estudiats l'èxit fins ara ha estat escàs, car cap presenta l'eficàcia del pèptid natural per reduir la ingestió d'aliment (Fernández-López et al., 2002). Recentment, per exemple, el desenvolupament de l'agonista GW-181771, ha estat aturat en fase II per baixa eficàcia (Castillo et al., 2004).

Antagonistes de la ghrelina

La supressió de l'acció de la ghrelina, hormona orexigènica sintetitzada per les cèl·lules oxíntiques del fundus gàstric, podria constituir potencialment una prometedora forma de tractament de l'obesitat. Les primeres dades de la seva possible eficàcia les trobem en els pacients als quals se'ls ha practicat un bypass gàstric, que presenten una disminució dels nivells de ghrelina que sembla estar associada a les pèrdues de pes que genera aquest tipus de cirurgia (Cummings et al., 2002). En l'actualitat estan en desenvolupament diferents antagonistes del seu receptor, com ara el L-756867 o L-692400 (Das i Chakrabarti, 2006), anticossos antighrelina i oligonucleòtids amb seqüència antisentit, els quals indueixen una disminució de la ingestió d'aliment i del pes corporal quan són administrats als animals d'experimentació (Huda et al., 2006).

Alguns treballs afirmen que els nivells de ghrelina són baixos en els individus obesos i que augmenten en resposta a la pèrdua de pes com a part d'un mecanisme compensatori que promou el guany de pes en defensa de l'organisme. D'acord amb aquesta idea, igual que succeeix amb la leptina, la potencial aplicació clínica de bloquejants del receptor de la ghrelina estaria més enfocada cap a evitar la recuperació del pes perdut amb altres tractaments que no en ser aplicats directament per promoure pèrdues de pes *de novo* (Foster-Schubert i Cummings, 2006).

Pramlintida

La pramlintida és un anàleg de l'amilina humana, hormona pancreàtica produïda per les cèl·lules β i factor clau de sadollament (Lutz, 2005). Els efectes anorèctics de la pramlintida es produeixen a través dels receptors d'amilina situats a l'àrea postrema del cervell. La pramlintida, actualment es troba dins de la fase II dels assajos clínics on ha presentat una reducció de pes tant en pacients obesos com diabètics de tipus 2 amb un bon perfil de seguretat (Chapman et al., 2005; Wadden et al., 2006). Una única dosi subcutània de pramlintida redueix significativament gana, efecte que està associat a un increment de la sensació de sadollament i a una reducció significativa de la durada dels àpats (Weyer et al., 2005).

2.1.2.1.1.7. ALTRES AGENTS MODIFICADORS DE LA INGESTIÓ D'ALIMENT

Antiepilèptics: topiramata i zonisamida

El topiramata i la zonisamida són dos antiepilèptics en els quals s'ha observat una acció supressora de la gana complementària (Ben-Menachem et al., 2003; Oommen, 1999).

El topiramata és un agonista GABA i antagonista glutamaèrgic que originàriament es va desenvolupar com a hipoglucemiant oral, i que va resultar no ser efectiu ja en la fase d'estudis amb animals. El seu efecte anorèctic podria ser degut a ser un antagonista del glutamat. S'ha

demonstrat que el topiramát provoca una pèrdua significativa de pes que es manté al llarg del temps, disminueix la pressió sanguínia i millora la tolerància a la glucosa (Wilding et al., 2004). Malgrat aquests resultats, la importància dels seus efectes adversos en el sistema nerviós (parestèsia, somnolència, dificultats en la memòria, la concentració i l'atenció, alteració de la percepció del sabor i desordres psiquiàtrics) ha fet que el seu desenvolupament com a agent antiobesitat hagi estat aturat a la fase III dels assajos clínics a l'espera d'una nova formulació que presenti una millor tolerància (Ioannides-Demos et al., 2005). Tot i així, una companyia farmacèutica ha desenvolupat un fàrmac resultant de la combinació del topiramát amb la fentermina, el Qnexa (VI-0521), amb el que s'acaben d'iniciar els estudis clínics de fase III per la bona eficàcia i seguretat presentada en la fase II (Aronne i Thornton-Jones, 2007).

La zonisamida és una sulfonamida amb activitat serotoninèrgica i dopaminèrgica, responsables del seu efecte anorèctic (Gadde et al., 2003). La zonisamida provoca una pèrdua de pes significativa respecte el grup placebo amb una bona tolerància i pocs efectes adversos. Únicament s'observa un increment significatiu en els nivells de creatinina en les primeres setmanes del tractament (Gadde et al., 2003). La zonisamida en combinació amb el bupropiòn són la base d'un nou fàrmac en desenvolupament, l'Excalia, que actualment es troba en fase II dels assajos clínics. Aquesta combinació maximitza l'alliberament d' α -MSH i de CART, i incrementa els nivells de 5-HT (Aronne i Thornton-Jones, 2007).

Leptina

La leptina, com ja s'ha explicat anteriorment, és una adipoquina sintetitzada i alliberada pel teixit adipós la qual té una acció inhibidòria de la gana per modificació de l'expressió de diferents neurotransmissors hipotalàmics, estimula el sistema nerviós simpàtic i incrementa la despesa energètica.

L'extraordinàriament rar fenotip obès causat per la seva deficiència va fer distingir a la leptina com probablement la molècula més important en el control de l'homeòstasi energètica i s'esperava d'ella que fos una teràpia efectiva contra l'obesitat. Però no ha estat així, la leptina ha estat avaluada repetidament com agent antiobesitat des de fa més de 10 anys sense èxit (Bryson, 2000; Heymsfield et al., 1999; Lönnqvist et al., 1999; Tritos i Mantzros, 1997). Sols és eficaç en la dotzena de pacients que són leptina-deficients i que presenten lipodistròfies.

El seu futur com a potencial fàrmac antiobesitat és molt qüestionable ja que la majoria d'obesos ja presenten nivells elevats de leptina i molts d'ells el que realment presenten és una insensibilitat o resistència a aquesta (Considine et al., 1996). Per tal d'augmentar aquesta sensibilitat a la leptina, estudis recents s'han centrat en la inhibició del supressor de la senyalització de citoquines 3 (SOCS3) i de la proteïna tirosina fosfatasa-1B (PTP1B), els quals actuen inhibint la via de senyalització de la leptina (Bjorbaek et al., 1998; Cheng et al., 2002). Tant l'activitat del SOCS3 com de la PTP1B s'ha vist incrementada en l'obesitat, fet que suggereix el paper d'aquests factors en l'etiologia de la resistència a la leptina (Wang et al.,

2005). Malgrat que la inhibició del SOCS3 i de la PTP1B incrementa les vies de senyalització activades per la leptina amb una reducció en els pes i el conferiment de resistència a l'obesitat induïda per la dieta, aquests factors no són una bona estratègia terapèutica per estar involucrats en altres vies de regulació (Foster-Schubert i Cummings, 2006).

En altres estudis s'ha estudiat l'acció d'una leptina recombinant humana en pacients obesos alimentats amb dieta hipocalòrica on s'ha observat una pèrdua de pes dosi-depenent que podria ser deguda a la capacitat de la leptina de contrarestar les adaptacions metabòliques i del comportament alimentari que acompanyen a les pèrdues de pes (Fogteloo et al., 2003; Rosenbaum et al., 2005).

Factor neurotròfic ciliar

El factor neurotròfic ciliar (CNTF) és una citoquina que exhibeix efectes neuroprotectors i que en un principi va ser desenvolupat pel tractament de les malalties neurodegeneratives. Sorprenentment, els pacients tractats amb el CNTF en els assajos clínics experimentaven pèrdues de pes al voltant del 10-15% (ALS CNTF Treatment Study Group, 1996). Aquest efecte va fer considerar al CNTF com a candidat pel tractament de l'obesitat.

El CNTF encara que presenta característiques molt similars a la leptina, s'ha comprovat que té una via d'acció completament independent. El factor neurotròfic ciliar redueix la ingesta i el pes en els ratolins deficients pel receptor de la leptina (Gloaguen et al., 1997). Aquest factor provoca pèrdues de pes independentment del sistema de les melanocortines, sent eficient en els ratolins deficients tant en la POMC com en el receptor MC4 (Anderson et al., 2003; Marsh et al., 1999). El més important, és que el factor neurotròfic ciliar també redueix el pes en els animals amb resistència a la leptina (Gloaguen et al., 1997).

S'ha comprovat que els efectes catabòlics del CNTF es perllonguen després d'una administració discontinua. Un mecanisme probable que explica aquest fenomen és que el factor neurotròfic ciliar indueix la proliferació de neurones que presenten elements de resposta a la leptina en els centres hipotalàmics de control de la ingesta (Kokoeva et al., 2005). Aquest efecte faria augmentar la sensibilitat hipotalàmica a la leptina. Aquesta observació ha obert un nou concepte en la recerca de nous agents pel tractament de l'obesitat, basats en una modificació de la plasticitat sinàptica per tal d'incrementar durant més temps l'eficàcia d'altres tractaments (Horvath, 2005; Kokoeva et al., 2005).

Basant-se en el CNTF, s'ha desenvolupat l'Axokine, una variant recombinant d'aquest factor. L'Axokine actua unint-se als receptors del factor neurotròfic ciliar presents a l'hipotàlem estimulants les vies inhibidores de la gana (Guler et al., 2001; Lambert et al., 2001). Malgrat trobar-se en fase III dels assajos clínics i presentar una bona tolerància, el desenvolupament de l'Axokine ha estat aturat recentment ja que un elevat percentatge dels pacients desenvolupaven

anticossos contra el CNTF, fet que limita la pèrdua de pes causada pel tractament (Ettinger et al., 2003).

2.1.2.1.2. AGENTS QUE MODIFIQUEN LA DISPONIBILITAT I ABSORCIÓ DE NUTRIENTS

2.1.2.1.2.1. SUBSTITUTIUS HIPOCALÒRICS

Una de les estratègies més comunes per limitar la quantitat d'energia ingerida és la substitució d'alguns nutrients amb elevat contingut calòric per substitutius acalòrics o hipocalòrics. Pel seu contingut energètic i la seva palatabilitat, els principals nutrients substituïts són els sucres i els greixos.

Edulcorants

L'ús de substitutius dels sucres o edulcorants és extremadament generalitzat en la nostra societat. Sovint aquests substitutius poden comportar un increment de la seva ingestió per falta de resposta de sadollament (Blundell i Green, 1996), i cal tenir present que poden ser responsables d'altres efectes, com l'efecte antidiabètic de la sacarina (Berthoud et al., 1981) o la perjudicial interacció del formaldehid derivat de l'aspartame amb els components cel·lulars (Trocho et al., 1998).

Olestra

L'olestra és un substitutiu del greix aprovat per la FDA en 1996. Està constituït per una barreja de hexa-, hepta-, i octaèsters formats de la reacció de la sacarosa amb àcids grassos de cadena llarga (Glueck et al., 1994; Rolls et al., 1992). El fet de no ser digerible ni absorbible el converteix en un substitutiu acalòric. Alguns estudis han demostrat que només és efectiu com a substitutiu en una dieta hipocalòrica. Algunes observacions assenyalen efectes beneficiosos sobre el perfil lipídic (Roy et al., 1995).

2.1.2.1.2.2. FÀRMACS QUE MODIFIQUEN L'ABSORCIÓ DE NUTRIENTS

Fibra

La fibra dietètica, encara que en sentit estricte no es pot definir com a fàrmac, és un agent que cal tenir present per la seva capacitat de limitar l'absorció de greixos i altres nutrients (Gazzaniga i Lupton, 1987). La fibra contribueix a augmentar la mida del bolus alimentari incrementant la sensació de sadollament. Malgrat el limitat efecte sobre el pes corporal, la fibra presenta altres propietats molt interessants per la millora de la situació patològica del pacient obès: retarda i dilata en el temps l'absorció de glucosa millorant la glucèmia de l'obès diabètic, presenta la capacitat de retenir el colesterol de la dieta contribuint a la millora de la

hipercolesterolèmia, i augmenta la mida del bolus fecal millorant l'estrenyiment que és freqüent en els pacients obesos.

Orlistat

L'orlistat o tetrahidrolipstatina és un fàrmac antiobesitat desenvolupat per procediments semisintètics a partir de lipstatina, un producte amb propietats inhibidores de lipases procedent de cultius de *Streptomyces toxytricini* (Guercioli, 1997), un fong del sòl. La capacitat inhibidora de les lipases és deguda a la presència d'un agrupament β -lactàmic.

L'orlistat, comercialitzat amb el nom de Xenical[®], és un dels tres fàrmacs autoritzat, juntament amb la sibutramina i el rimonabant, pel tractament de l'obesitat a llarg termini en adults a Europa. Recentment, la FDA ha aprovat el seu ús als EEUU pel tractament de l'obesitat infantil. L'orlistat és un potent inhibidor de les lipases gastrointestinals, que disminueix l'absorció de greixos, al voltant d'un 30%, i incrementa l'excreció fecal d'aquests. L'orlistat s'uneix a la lipasa pancreàtica impeding la hidròlisi dels triacilglicerols i la posterior absorció dels àcids grassos per la mucosa intestinal (Drent et al., 1995; Hogan et al., 1987). Com a conseqüència de la reducció de l'absorció de greixos es forma a l'intestí una fase oliosa persistent que pot afavorir el segrest del colesterol present als aliment, col·laborant d'aquesta manera en la reducció de la seva absorció (Curran i Scott, 2004).

En general, la resposta després d'un any de tractament (acompanyat d'una dieta hipocalòrica) implica una reducció de més del 5% del pes corporal en el 70-80% dels pacients amb sobrepès, davant d'un 50-55% aconseguit només amb dieta i placebo. Malgrat que les pèrdues de pes són moderades, aquestes són suficients per millorar alguns dels paràmetres associats a la síndrome metabòlica: es redueixen els nivells de triacilglicerols i colesterol plasmàtics, hi ha una millora de la tolerància a la glucosa i una caiguda relativa de la pressió sanguínia (Davidson et al., 1999).

La disminució en l'absorció de greixos va acompanyada de tota una sèrie d'efectes a nivell gastrointestinal no desitjats, com esteatorrea, urgència fecal, augment de la freqüència de les defecacions, flatulències, incontinència fecal i manca d'absorció de les vitamines liposolubles, sent necessària en ocasions la seva suplementació (Melia et al., 1996). Aquests efectes es produeixen en un elevat nombre de pacients i depenen de la presència de greix a la dieta. Malgrat que els efectes són conceptualment poc importants si que són molt incòmodes, el que fa que els pacients decideixin abandonar el tractament o eliminar quasi bé totalment els greixos de la dieta.

L'èxit, probablement immerescut, de l'orlistat ha estimulat a moltes companyies farmacèutiques en centrar les seves investigacions en aquest camp, desenvolupant fàrmacs amb la capacitat inhibidora de les lipases de l'orlistat i intentant millorar els efectes adversos que el seu tractament presenta. Un bon exemple són el cetilistat, un inhibidor oral sintètic de

les lipases que actualment està a punt d'iniciar la fase clínica III (Kopelman et al., 2004) o el GT-389255 que es troba en fase I (Peptimmune, 2005). Probablement l'èxit de l'orlistat malgrat la seva pobra eficiència és degut a la seva seguretat i a la manca real de fàrmacs "que funcionin" per reduir el pes dels obesos.

2.1.2.2. FÀRMACS TERMOGÈNICS

S'ha observat que alguns obesos mostren valors baixos de despesa energètica; així s'ha descrit una resposta termogènica disminuïda als aliments (Bessard et al., 1983) o una escassa potenciació de la despesa amb l'exercici (Segal et al., 1984). La investigació de fàrmacs termogènics és una de les principals línies de investigació pel tractament de l'obesitat, aquests augmentarien les pèrdues d'energia.

Molts estudis impliquen el sistema nerviós autònom en la patogènia de l'obesitat; en models animals s'ha demostrat una disminució del recanvi de noradrenalina (Levin et al., 1983) i en humans, encara que no hi ha dades concloents, s'han observat nivells més baixos de noradrenalina en els individus obesos (Munger et al., 1990). Aquesta disminució de l'activitat simpàtica originaria una disminució de la termogènesi i podria contribuir al desenvolupament de l'obesitat. Així que es podria actuar farmacològicament sobre el sistema nerviós simpàtic augmentant l'alliberament de noradrenalina o inhibint el seu catabolisme i recaptació.

2.1.2.2.1. FÀRMACS ADRENÈRGICS

La majoria dels fàrmacs termogènics en desenvolupament són agents adrenèrgics, els quals actuen a diferents nivells però sempre mimetitzant l'estimulació del sistema nerviós simpàtic sobre la lipòlisi i la termogènesi.

| Receptor | Mecanisme efector | Funció | |
|-----------------------------|--|-----------------------------|----------------------------|
| | | TAM | TAB |
| α_1 | Augment de Ca^{2+} i proteïna quinasa | Increment de la termogènesi | ? |
| α_2 | Inhibició de l'adenilat ciclasa i generació d'AMPc | Inhibició de la termogènesi | Inhibició de la lipòlisi |
| $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ | Estimulació de l'adenilat ciclasa i generació d'AMPc | Increment de la termogènesi | Estimulació de la lipòlisi |

Taula 4. Funció i mecanismes efectors dels receptors adrenèrgics al teixit adipós.

Agonistes dels receptors adrenèrgics β_3

Els agonistes del receptor adrenèrgic β_3 ($\beta_3\text{AR}$) probablement constitueixen el grup de fàrmacs antiobesitat més estudiat per diferents companyies en paral·lel. És molt àmplia l'oferta dels agonistes del $\beta_3\text{AR}$ que es troben en fase clínica, però encara ho és més la dels abandonats per la baixa eficàcia i l'escassa seguretat (Arch, 2002).

Els agonistes del β_3 AR són un grup bastant homogeni quan als efectes, tots presenten una bona estimulació de l'activitat termogènica i lipolítica incrementant la despesa energètica, però químicament ens podem trobar amb diverses famílies de fàrmacs (Fernández-López et al., 2002). El grup d'agonistes dels β_3 AR també comparteix molts dels efectes adversos: produeixen taquicàrdia i tremolor degut a que també són agonistes parcials dels receptors adrenèrgics β_1 i β_2 .

Per evitar aquests efectes les investigacions s'han centrat en el desenvolupament de fàrmacs amb efecte agonista β_3 més selectiu, evitant els efectes negatius sobre la funció cardíaca, la pressió arterial i altres efectes estimulants. Els fàrmacs experimentals Ro 40-2148, BRL 35135, ICI D7114, L-796568 i CL316,243 són exemples d'aquests agonistes de segona generació. El **CL316,243** incrementa la despesa energètica en ratolins control però no en ratolins β_3 AR^{-/-}, confirmant que els seus efectes metabòlics es produeixen específicament a través d'aquest receptor (Susulic et al., 1995). Les rates tractades amb CL316,243 presenten una disminució del greix corporal, un increment de l'energia alliberada i un augment de la massa del teixit adipós marró. Els canvis en la ingestió d'aliment no són significatius (Himmshagen et al., 1994).

Malgrat els bons resultats presentats en rosegadors, l'eficàcia del tractament amb agonistes dels β_3 AR en humans no ha estat l'esperada producte dels fenòmens de retroinhibició dels β_3 AR resultat de l'exposició continuada a l'agonista, de la marcada diferència entre el β_3 AR humà i de rosegadors, del paper poc important del TAM en els humans adults i dels efectes contrareguladors dels glucocorticoides (Granneman i Lahners, 1994; Pietri-Rouxel i Strosberg, 1995).

Efedrina

L'efedrina, sola o en combinació està autoritzada pel tractament de l'excés de pes en alguns països com ara Dinamarca, però no està aprovada pel tractament de l'obesitat pràcticament enlloc més.

L'efedrina és un agonista no específic dels receptors adrenèrgics α i β que actua tant a nivell central com perifèric. Estimula directament els receptors β -adrenèrgics i els terminals dels nervis simpàtics induint l'alliberament de noradrenalina i incrementant la termogènesi (Liu et al., 1995).

És molt freqüent la combinació de l'efedrina amb metilxantines, com ara la cafeïna, les quals potencien clarament el seu efecte termogènic, ja que l'AMPc format per l'estimulació adrenèrgica perdura més temps a la cèl·lula exercint la seva acció senyalitzadora gràcies a l'efecte inhibitori de les metilxantines sobre la fosfodiesterasa (Dulloo i Miller, 1987). També l'aspirina és un bon potenciador dels efectes termogènics de l'efedrina a l'inhibir la síntesi de

prostaglandines que aturen l'alliberament de noradrenalina a nivell dels terminals simpàtics (Daly et al., 1993).

Malgrat estar reconeguda la capacitat de l'efedrina per induir la termogènesi, la seva prescripció ha estat limitada per la presència d'efectes secundaris com hipertensió arterial, taquicàrdia i nerviosisme, resultat de l'estimulació no selectiva dels receptors adrenèrgics α i β . La seva prescripció ha estat reservada sols per a aquells individus obesos en els que s'ha demostrat, mitjançant estudis calorimètrics, una disminució de la despesa energètica.

2.1.2.2.2. HORMONES TIROÏDALS

El fet que l'hipertiroïdisme estigués associat a una baixa adipositat va promoure la utilització de les hormones tiroïdals pel tractament de l'obesitat fins els anys 80. Malgrat la seva administració a baixes concentracions, els seus efectes adversos sobre el sistema cardiovascular i altres complicacions derivades de d'hipertiroïdisme van limitar la seva utilització. Tot i així, la capacitat d'incrementar la taxa metabòlica i la lipòlisi, l'activitat antidiabètica i la capacitat de reduir el colesterol de les hormones tiroïdals ha fet que aquests components continuïn sent objecte d'estudi pel seu desenvolupament com a agents antiobesitat (Krotkiewski, 2000). La utilització incontrolada com a fàrmac antiobesitat és una de les principals causes d'intoxicació iatrogènica i del frau amb "fórmules miraculoses".

Actualment, experiments realitzats amb ratolins *knockout* pel receptor d'hormones tiroïdals α (TR α) han permès comprovar que la capacitat d'incrementar la taxa metabòlica i de reduir els nivells de colesterol de les hormones tiroïdals és deguda a la seva unió al receptor β (TR β). L'estimulació selectiva d'aquest TR β evita els efectes cardíacs adversos, la pèrdua de massa muscular i altres símptomes derivats de la tirotoxicosi (Grover et al., 2007). Aquest descobriment ha permès el desenvolupament de tiromimètics selectius pel TR β , com ara el KB-141. El KB-141 incrementa el consum d'oxigen i la taxa metabòlica provocant una pèrdua de pes significativa sense necessitat de restricció calòrica tant en rosegadors com en primats. El tractament amb el KB-141 indueix una reducció dosi-depenent dels nivells de colesterol, amb efectes mínims sobre la resposta cardíaca i la massa muscular. En paral·lel el KB-141 també redueix l'expressió de la TSH, el que es podria convertir en un problema potencial de la seva utilització, ja que si la TSH està massa deprimida es podria produir hipotiroïdisme paradoxal que actuaria sobre el TR α i generaria bona part dels problemes que es tracta d'evitar (Grover et al., 2007).

2.1.2.3. ALTRES APROXIMACIONS FARMACOLÒGIQUES

2.1.2.3.1. ANÀLEGS DE L'HORMONA DE CREIXEMENT

El receptor de l'hormona del creixement (GH) és una altre potencial diana terapèutica ja que s'ha observat que els nivells de GH estan reduïts en l'obesitat (Shadid et al., 2003). L'AOD9604

és un pèptid sintètic anàleg a un fragment de l'hormona de creixement humana que es troba en fase II dels assajos clínics. L'AOD9604 mimetitzava els efectes beneficiosos de la GH sobre el teixit adipós, eliminant els efectes no desitjats que es troben quan s'administra l'hormona sencera (Aronne i Thornton-Jones, 2007; Heffernan et al., 2000).

2.1.2.3.2. AGENTS MODULADORS DEL METABOLISME LIPÍDIC

Actualment l'objectiu de moltes aproximacions farmacològiques és actuar directament sobre els moduladors del metabolisme lipídic, amb l'objectiu d'intentar reduir la síntesi d'àcids grassos o la seva incorporació, augmentar la lipòlisi o l'oxidació lipídica, o disminuir la lipogènesi, ens podem trobar amb una àmplia varietat d'estratègies (Das i Chakrabarti, 2006; Fernández-López et al., 2002): inhibidors d'enzims clau de la via lipogènica, com el complex àcid gras sintetasa (FAS), que catalitza la síntesi *de novo* dels àcids grassos saturats (Loftus et al., 2000), o l'acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1), enzim clau en la regulació de la β -oxidació mitocondrial (Berggren et al., 2003; Kopka et al., 2004) o estimuladors del transport dels àcids grassos (Decombaz et al., 1987).

Carnitina

La carnitina és una molècula que té la capacitat d'incrementar el transport dels àcids grassos a la mitocondria, i així afavorir la seva oxidació (Decombaz et al., 1987). La carnitina va començar a comercialitzar-se com a suplement dietètic per augmentar el rendiment dels esportistes, però posteriorment, i sense cap base científica, moltes companyies dietètiques l'han fet servir com a suplement de molts productes venent la idea de que presenta efectes aprimadors. Tot i l'existència de molts estudis que avaluen la seva total ineffectivitat, la creença popular i el marketing agressiu de les companyies dietètiques fan que la carnitina continuï sent una molècula àmpliament utilitzada.

Agonistes del PPAR α

El PPAR α és probablement el principal agent regulador del catabolisme dels àcids grassos al fetge (Lee et al., 2003). Estudis realitzats amb ratolins *knockout* pel PPAR α evidencien la possible implicació d'aquest receptor en el desenvolupament de l'obesitat. Aquests ratolins presenten símptomes d'hiperfàgia al ser alimentats amb una dieta hiperlipídica (Costet et al., 1998; Lee et al., 2002).

Els agonistes del PPAR α podrien actuar disminuint les reserves lipídiques i el pes, induint la β -oxidació i possiblement la sensació de sadollament. Un dels agonistes del PPAR α més estudiats és l'oleoiletanolamida (OEA). A través de la seva unió al PPAR α , l'OEA redueix la gana (Fu et al., 2003; Rodríguez de Fonseca et al., 2001) i estimula la lipòlisi (Guzmán et al., 2004) induint una pèrdua de pes en animals d'experimentació. El PPAR α també és diana de l'acció dels fibrats, els quals són actualment utilitzats com a teràpia hipolipemiant (Balfour et al., 1990;

Muls et al., 1997). Els fibrats incrementen les lipoproteïnes HDL i disminueixen els nivells de triacilglicerols reduint la incidència de malaltia coronària (Topin i Freedman, 2006).

Agonistes del PPAR β

Estudis recents han permès presentar al PPAR β o PPAR δ com un important regulador de la despesa energètica, del metabolisme glucídic i del metabolisme lipídic, obrint les portes a noves investigacions per a un possible ús terapèutic dels seus lligands pel tractament de l'obesitat i dels desordres associats (Tobin i Freedman, 2006).

L'administració del GW501516, un agonista del PPAR β que es troba en fase II dels estudis clínics (Oliver et al., 2001), indueix l'expressió de diferents gens implicats en el catabolisme lipídic i la despesa energètica en el múscul esquelètic (Dressel et al., 2003). El GW501516 incrementa l'oxidació dels àcids grassos i el consum d'oxigen al múscul; també disminueix els nivells de triacilglicerols mentre incrementa el colesterol-HDL. També s'ha observat que la sobreexpressió d'una forma activada del PPAR β confereix resistència al desenvolupament de l'obesitat induïda per la dieta i a la hiperlipidèmia, incrementant la taxa metabòlica i la utilització de lípids tant al múscul esquelètic com al teixit adipós, i també produint una disminució dels dipòsits de greix, tant viscerals com subcutanis (Wang et al., 2003; 2004).

Antagonistes del PPAR γ

El fet de que el tractament amb tiazolidinacions (TZD), agonistes del PPAR γ utilitzades clínicament pel tractament de la resistència a la insulina i la diabetis de tipus 2 (Yki-Jarvinen, 2004), promogui increments de pes, va fer pensar en la possible implicació d'aquests receptors en el desenvolupament de l'obesitat (Martens et al., 2002). La creació de ratolins *knockouts* heterozigots pel PPAR γ , ha permès la confirmació d'aquesta implicació. Els *knockouts* presenten una millor sensibilitat a la insulina, una disminució de la ingesta al ser alimentats amb dieta hiperlipídica, i disminució del greix corporal responsable de la diferència de pes respecte dels controls (Yamauchi et al., 2001). Aquestes observacions obren la possibilitat de desenvolupar antagonistes dels PPAR γ , com ara el BADGE (Yamauchi et al., 2001) o el SR-202 (Riusset et al., 2002), que millorin la sensibilitat a la insulina com fan ara els agonistes actuals, però sense provocar un augment de les reserves lipídiques de l'organisme.

2.1.2.3.3. HORMONES ESTEROÏDALS

Agonistes del receptor d'estrògens α

El fet que els estrògens presentin una marcada influència en el contingut de reserves de l'organisme i que els ratolins *knockouts* pel receptor d'estrògens α (ER α) presentin un pes corporal, unes reserves lipídiques i una menor despesa energètica que els controls (Heine et al., 2000), ha fet que moltes companyies centrin les seves investigacions en la recerca d'anàlegs

dels estrògens pel tractament de l'obesitat. L'administració d'agonistes de l'ER α , com el EM-652, produeixen una pèrdua de pes i una disminució de les reserves grasses i de la ingestió d'aliments tant en ratolí com en rata, aturant els guanys produïts per l'ovarectomia (Lemieux et al., 2003). Els efectes de l'administració del EM-652 no s'han observat en el ratolí *knockouts* pel ER α , confirmant que les efectes dels estrògens sobre el pes corporal són mediatos a través d'aquest receptor (Geary et al., 2001).

Posteriorment, l'estudi amb altres models genètics de ratolins, com el *knockout* per l'aromatasa o per l'hormona estimulant de fol·licles, caracteritzats per la deficiència en estrògens i que també presenten un increment del pes corporal, han permès confirmar el paper dels estrògens en el desenvolupament de l'obesitat (Danilovich et al., 2000; Jones et al., 2000).

En els humans, la influència dels estrògens sobre el pes no resulta tant marcada; més que a un increment net de les reserves grasses, la baixada d'estrògens que caracteritza a la menopausa s'ha associat una redistribució del greix corporal (Carr, 2003). La teràpia substitutiva amb estrògens limita l'aparició de l'obesitat visceral associada a la menopausa.

2.2. LA SÍNDROME METABÒLICA

La definició de la síndrome metabòlica (també conegut com a "quartet mortal", síndrome X o síndrome de la resistència a la insulina), ja proposada per Reaven al 1988 continua sent tema de controvèrsia avui en dia. Reaven va definir amb el terme de síndrome X a la tendència a la intolerància a la glucosa, hipertensió, nivells baixos de colesterol-HDL, hipertriglicerolemia i hiperinsulinèmia presentada en un mateix individu (Reaven, 1988). Va proposar que la resistència a la insulina era l'alteració essencial de la síndrome no incloent en la seva descripció inicial la presència d'obesitat.

Des d'aleshores la seva definició i descripció han anat variant segons els criteris utilitzats per a la seva diagnosi (Taula 5). Recentment la Federació Internacional de Diabetis (IDF) ha proposat una nova definició amb l'esperança de ser utilitzada com estàndard internacional (Alberti et al., 2005); defineix la síndrome metabòlica o síndrome X per la presència d'obesitat abdominal acompanyada com a mínim de dues de les alteracions metabòliques següents: hipertriglicerolemia, baixos nivells de colesterol-HDL, pressió sanguínia elevada i hiperglucèmia en dejuni ($\geq 5,6$ mM) o diabetis diagnosticada, totes elles importants factors de risc de desenvolupament de malalties cardiovasculars i diabetis de tipus 2. A aquests components centrals, posteriorment s'ha proposat incloure com a nous criteris addicionals de diagnosi la hiperuricèmia, l'elevació de factors protrombòtics com el PAI-1 i el fibrinogen, i l'augment de factors proinflamatoris com la proteïna C-reactiva, tots ells també associats amb un elevat risc de malaltia cardiovascular.

| Reaven 1988 | OMS 1999 | NCEP:ATP-III 2001 | IDF 2005 |
|--|--|--|--|
| Definició de la síndrome metabòlica | | | |
| <p>Criteria per a la definició de la síndrome X no donat. Característiques comunes de la resistència a la insulina, sense necessitat de estar totes presents en un mateix individu</p> | <p>Intolerància a la glucosa i/o resistència a la insulina més almenys dues dels altres components</p> | <p>Presència de tres o més dels components</p> | <p>Presència d'obesitat central més almenys dos dels altres components</p> |
| Components de la síndrome | | | |
| Resistència a la insulina | Resistència a la insulina | | |
| Hiperinsulinèmia | | | |
| Intolerància a la glucosa | Regulació de la glucosa alterada o diabetis | Nivells de glucosa en dejuni $\geq 6,1$ mM o diabetis diagnosticada | Nivells de glucosa en dejuni $\geq 5,6$ mM o diabetis diagnosticada |
| | Obesitat central: relació cintura-malucs $> 0,9$ en homes; $> 0,85$ en dones, i/o IMC > 30 kg/m ² | Obesitat abdominal: perímetre de la cintura > 102 cm en homes; > 88 en dones | Obesitat abdominal: cada grup ètnic presenta en seu punt de tall |
| Increment dels triacilglicerols de les VLDL | Triacilglicerols plasmàtics incrementats: $\geq 1,7$ mM i/o nivells baixos de HDL-colesterol: $< 0,9$ mM en homes; < 1 mM en dones | Triacilglicerols plasmàtics incrementats: $\geq 1,7$ mM | Triacilglicerols plasmàtics incrementats: $\geq 1,7$ mM |
| Disminució del colesterol-HDL | | Nivells baixos de colesterol-HDL: $< 1,0$ mM en homes; $< 1,3$ mM en dones | Nivells baixos de colesterol-HDL: $< 1,0$ mM en homes; $< 1,3$ mM en dones |
| Hipertensió | Pressió sanguínia elevada ($\geq 140/90$ mmHg) | Pressió sanguínia elevada $\geq 130/85$ o hipertensió diagnosticada i tractada | Pressió sanguínia elevada $\geq 130/85$ o hipertensió diagnosticada i tractada |
| | Microalbuminúria (taxa d'excreció urinària d'albúmina ≥ 20 µg/min o relació albúmina-creatinina ≥ 30 mg/g) | | |

Taula 5. Comparació de les diferents definicions de la síndrome metabòlica i les seves components. OMS: Organització Mundial de la Salut; NCEP-ATP III: National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III; IDF: International Diabetes Federation (Adaptació de Urwin, 2006).

Actualment el terme de síndrome de la resistència a la insulina no és acceptat ja que suggereix a aquesta resistència com a mecanisme essencial de la malaltia, i probablement aquesta no és encara l'arrel del problema (de la síndrome), ja que en la base cal buscar els processos d'inflamació i l'efecte combinat de grups de gens que responen a factors ambientals. El terme de síndrome X o síndrome metabòlica són molt més neutrals (Unwin, 2006).

Com a resultat pràctic de les controvèrsies sobre la definició dels límits clínics de la síndrome metabòlica, resulta difícil establir la seva prevalença en les diferents poblacions resulta difícil, ja que aquesta variarà en funció del criteri de diagnosi utilitzat. El que sí que es pot afirmar és que la prevalença de la síndrome metabòlica està augmentant considerablement, i que comporta un augment associat de la morbiditat i mortalitat relacionades amb la malaltia cardiovascular i la diabetis (Cameron et al., 2004).

2.2.1. PATOFISIOLOGIA DE LA SÍNDROME METABÒLICA

L'obesitat visceral, la resistència a la insulina i tot un conjunt de molècules d'origen hepàtic, vascular i immune, han estat identificats com els factors determinants de la patogènia de la síndrome metabòlica (Lakka et al., 2002).

La resistència a la insulina provoca un increment dels àcids grassos circulants per l'anul·lació de l'efecte antilipolític de la insulina (Jensen et al., 1989). A la vegada, aquest efecte lipolític es veu incrementat pels propis àcids grassos que accentuen la resistència a la insulina en diferents teixits. Al fetge l'increment del flux d'àcids grassos lliures incrementa la producció de glucosa, de triacilglicerols i la secreció de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL); i al múscul trobem una acumulació de triacilglicerols. A aquestes alteracions, i com a conseqüència de la marcada hipertriacilglicerolemia, s'han d'afegir la reducció de les lipoproteïnes HDL i l'increment de les lipoproteïnes LDL; augmentant el risc cardiovascular. L'increment dels nivells de glucosa i àcids grassos plasmàtics estimula la secreció d'insulina pancreàtica, provocant una hiperinsulinèmia que accentua molt més la resistència a la insulina, i que pot desencadenar una intolerància a la glucosa, així com, si existeix predisposició genètica, un elevat risc de desenvolupar diabetis. Per altra banda, la hiperinsulinèmia pot incrementar la reabsorció de sodi, augmentant l'activitat del sistema nerviós simpàtic i contribuint així al desenvolupament de la hipertensió arterial (Eckel et al., 2005) (Figura 4, A).

Si a aquest quadre patològic li afegim la presència d'obesitat visceral la situació es complica encara més. Per una banda, l'obesitat contribueix a incrementar el flux d'àcids grassos lliures derivats del TAB i per un altre afavoreix l'estat proinflamatori per l'augment de la producció i secreció de citoquines, com la IL-6 i el TNF- α , que afavoreixen la resistència a la insulina. Aquestes citoquines i els àcids grassos lliures incrementen la producció de PAI-1 i fibrinogen induint un estat protrombòtic. La reducció de l'adiponectina i l'augment de la proteïna C-reactiva associats també a la síndrome metabòlica potencien encara més el risc d'esdeveniments cardiovasculars (Eckel et al., 2005) (Figura 4, B).

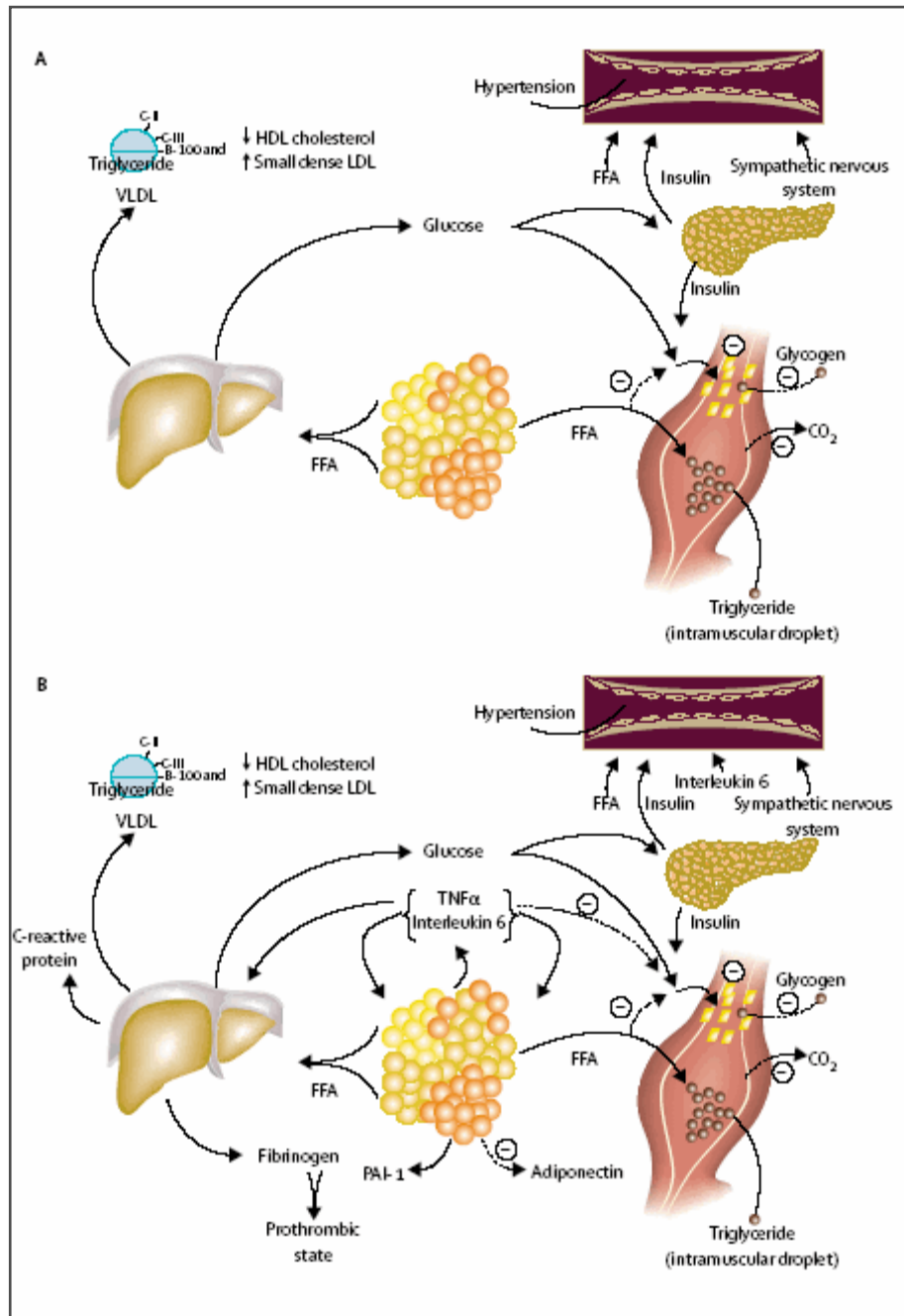


Figura 4. Patofisiologia de la síndrome metabòlica (Eckel et al., 2005).

2.2.2. TRACTAMENT DE LA SÍNDROME METABÒLICA

Les recomanacions habituals per a un pacient de síndrome metabòlica inclouen clàssicament el control energètic de la dieta i l'augment de l'activitat física. L'exercici combinat amb la restricció calòrica ens mostra com una de les poques estratègies vàlides de reducció de l'obesitat i les comorbilitats associades malgrat que amb marcades limitacions. Els principals objectius són el manteniment d'un pes corporal raonable, conservar els nivells de glucosa en sang tant a prop del rang normal com sigui possible, aconseguir uns nivells lipídics òptims en sèrum i assolir una pressió sanguínia òptima.

L'obesitat i la diabetis mellitus de tipus 2 estan fortament associades. Després de la predisposició genètica, l'obesitat és el factor de risc més important pel desenvolupament d'aquesta diabetis. Prop del 80% dels pacients amb diabetis mellitus de tipus 2 presenten sobrepès o són obesos, i el risc de desenvolupar diabetis de tipus 2 augmenta de manera exponencial d'acord amb l'índex de massa corporal (Scheen, 2003). Una dieta i estil de vida adequats estan associats amb un menor risc de diabetis tipus 2 (Hu et al., 2001). Estudis recents demostren que després d'una mitjana de 3 anys de canvi en l'estil de vida, incloent dieta i exercici, es pot reduir en un 58% el risc relatiu de desenvolupar diabetis tipus 2 en pacients obesos amb la tolerància a la glucosa alterada (Tuomilehto et al., 2001).

Aquestes modificacions de l'estil de vida permeten aconseguir una pèrdua substancial de pes que porta associada una marcada i ràpida millora del control glucèmic, però en molts casos no és suficient i han d'anar complementades per tractaments farmacològics que permetin reduir encara més el pes corporal (agents antiobesitat), que millorin la glucèmia (agents antidiabètics) i que corregeixin els factors associats al risc cardiovascular (antihipertensius i agents hipolipidemiants) (Figura 5).

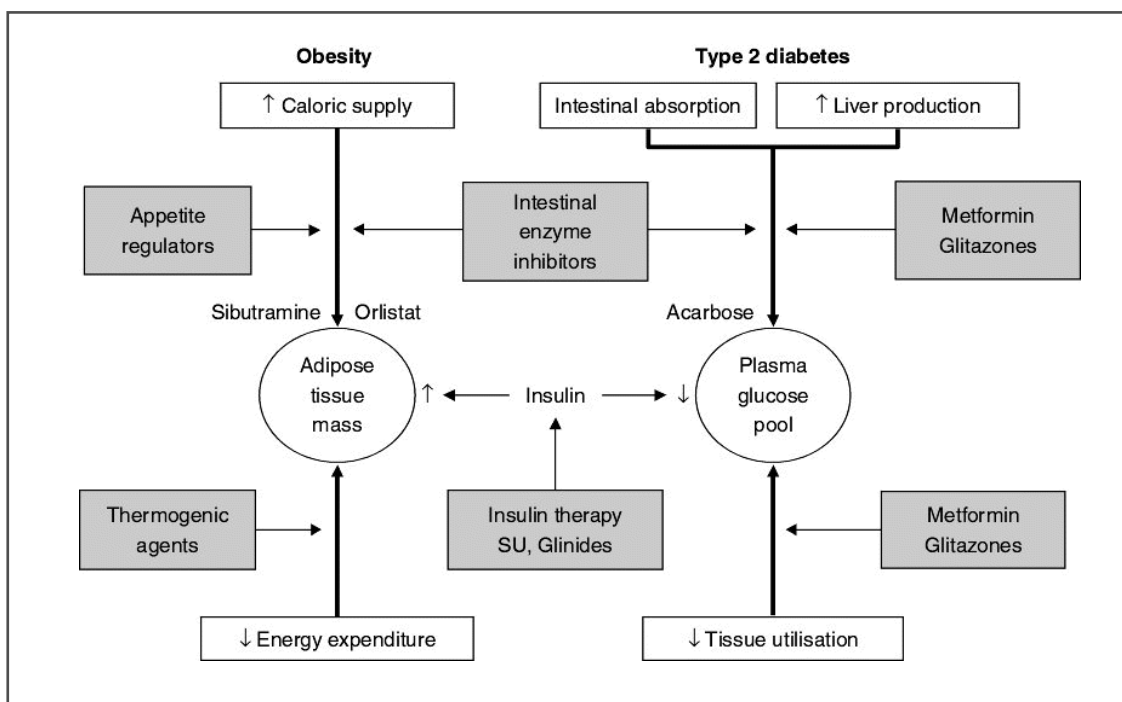


Figura 5. Possible esquema d'actuació pel tractament del pacient diabètic obès (Scheen, 2003).

2.2.2.1. FÀRMACS ANTIDIABÈTICS

Són cinc les classes farmacològiques d'agents orals actualment utilitzades pel tractament de la diabetis mellitus de tipus 2: sulfonilurees, anàlegs de la meglitinida, biguanides, inhibidors de la α -glucosidasa i les tiazolidinacions (Lebovitz, 2001). Quan falla la resposta al tractament oral, es pot recórrer a la teràpia amb insulina, sola o en combinació amb agents

hipoglucemians orals. La selecció de l'antidiabètic més adient depèn de diversos factors, com la gravetat de la hiperglucèmia i la presència d'obesitat.

Sulfonilurees

Quan la secreció de insulina és insuficient per compensar la resistència a la insulina l'administració de sulfonilurees (glibenclàmida, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona) com a estimulants de l'alliberament de insulina per part de les cèl·lules β pot ser una bona solució contra la hiperglucèmia (Groop, 1992). La teràpia amb sulfonilurees sovint ha d'anar acompanyada d'una dieta adequada, ja que pot provocar un guany de pes (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998). Per tant, habitualment les sulfonilurees no són considerades com a primera elecció farmacològica pel tractament del pacient diabètic obès.

Anàlegs de la meglitinida

Els secretagogues (repaglinida, nateglinida) són una altre opció per al tractament de la diabetis de tipus 2, com a monoteràpia i/o en associació amb metformina o una glitazona (Landgraf, 2000). Es caracteritzen per la ràpida però curta durada de la seva acció, sent recomanades sobre tot pel control de la hiperglucèmia postprandial.

Biguanides: Metformina

La metformina és l'únic component d'aquest grup que encara està disponible en molts països. És particularment recomanada tant pels diabètics obesos com pels no obesos. La metformina disminueix els nivells de glucosa plasmàtics sense incrementar (fins i tot s'ha observat una disminució) la concentració de insulina circulant, el que suggereix una millora de la sensibilitat a la insulina. A més, al contrari que les sulfonilurees no causa increment de pes ni hipoglucèmia (Johansen, 1999).

Hi ha estudis que demostren que la teràpia amb metformina promou una reducció de la ingestió d'aliment (Paolisso et al., 1998) i que disminueix el guany de pes en pacients diabètics que estan rebent insulina exògena. Tanmateix la monoteràpia amb metformina es troba associada a una reducció significativa de les complicacions i de la morbiditat cardiovascular associades a la diabetis, sent considerada com una de les millors alternatives pel tractament de la síndrome metabòlica (Kirpichnikov et al., 2002).

Inhibidors de la α -glucosidasa

Els inhibidors de la α -glucosidasa (acarbonsa, miglitol, voglibosa) retarden l'absorció intestinal dels polisacàrids d'elevat pes molecular. D'aquesta manera redueixen la hiperinsulinèmia postprandial sense promoure un guany de pes. Es consideren una bona teràpia de complement pels pacients obesos amb diabetis insuficientment controlada per la dieta (Lebovitz, 1998).

Tiazolidinadiones

Les tiazolidinadiones (TZD) com la rosiglitazona, la pioglitazona i la troglitazona aquesta última ja retirada del mercat per la seva hepatotoxicitat, augmenten l'acció de la insulina i la seva sensibilitat, promovent la utilització de glucosa pels teixits perifèrics i disminuint la gluconeogènesi al fetge (Saltiel i Olefsky, 1996).

Les TZD actuen a través del PPAR γ , membre de la superfamília de receptors nuclears activadors de la proliferació de peroxisomes, activant l'expressió de nombrosos gens que codifiquen proteïnes implicades en el metabolisme energètic, lipídic i glucídic (Spiegelman, 1998). Les tiazolidinadiones estimulen l'adipogènesi i redueixen els nivells plasmàtics dels àcids grassos lliures. L'estimulació del PPAR γ disminueix l'alliberament de diverses molècules senyalitzadores per part dels adipòcits, com ara àcids grassos lliures, leptina o TNF α , capaces de contrarestar l'acció hipoglucèmica de la insulina (Spiegelman, 1998).

Nombrosos estudis demostren que les TZD milloren els nivells plasmàtics de glucosa en pacients diabètics de tipus 2 en comparació amb altres tractaments. S'ha trobat un sinergisme positiu entre la metformina i la troglitazona, ja que el primer fàrmac exerceix la seva acció predominantment al fetge, mentre que el segon ho fa incrementant la sensibilitat de manera predominant al múscul esquelètic (Inzucchi et al., 1998). Aquest efecte complementari també ha estat confirmat amb la rosiglitazona (Fonseca et al., 2000) i la pioglitazona (Einhorn et al., 2000).

Els efectes de les glitazones sobre el metabolisme lipídic estan menys clars. S'ha observat un lleu increment dels nivells de colesterol-LDL i -HDL sense que es produeixin efectes sobre els nivells de triacilglicerols (Scheen, 2003).

Els estudis clínics mostren un lleuger, però significatiu, guany de pes en pacients diabètics tractats amb glitazones a llarg termini; l'acumulació de greix subcutani i la retenció de líquids en podrien ser els mecanismes responsables. A més com ja s'ha dit anteriorment, aquests compostos actuen sobre els receptors nuclears PPAR γ , promotors de l'adipogènesi (Saltiel i Olefsky, 1996; Spiegelman, 1998). També s'ha observat que el tractament amb troglitazona redueix els nivells plasmàtics de leptina i incrementa la gana (Shimizu et al., 1998). Altres estudis amb rosiglitazona i pioglitazona han confirmat aquest increment de deposició subcutània però amb una disminució del greix visceral, amb efectes més patogènics, posant de manifest la contribució d'aquests agents a la redistribució del teixit adipós i el seu paper beneficiós sobre el metabolisme malgrat el moderat guany de pes (Carey et al., 2002). Cal, doncs, fer estudis a llarg termini, que potser podrien fer disminuir el seu interès clínic en cas de confirmar-se els seus efectes sobre el pes corporal.

Insulina

L'administració d'insulina exògena és efectiva en pacients diabètics amb normopes o amb sobrepès que no responen als hipoglucemians orals, però rarament és una bona opció terapèutica en pacients diabètics obesos per la forta resistència a la insulina que presenten, juntament amb l'elevat risc d'incrementar el seu pes i la pressió arterial (Scheen, 1996). La teràpia amb insulina hauria de ser, doncs, complementada amb una profunda modificació dels hàbits alimentaris, tot reservant-la pels casos en que altres estratègies menys agressives hagin fallat.

Teràpia combinada

La naturalesa heterogènia de la diabetis de tipus 2, caracteritzada per múltiples anomalies metabòliques i hormonals fa que es plantegi la combinació de diferents teràpies farmacològiques amb l'objectiu d'obtenir sinèrgies entre elles amb un impacte positiu a diferents nivells. Quan la insulina ja és la única opció terapèutica en pacients diabètics obesos, generalment es combina amb hipoglucemians orals, que promouen la seva acció impedit un excessiu guany de pes. Quan es combina la insulina amb la metformina s'observa una reducció significativa dels factors de risc cardiovascular (Giugliano et al., 1993). Altres opcions són la combinació de la insulina amb acarbosa quan hi ha una marcada hiperglucèmia postprandial (Coniff et al., 1995), o amb pramlintida, que comporta un lent buidat gàstric, reduint la hiperglucèmia postprandial a l'hora que s'aconsegueix una certa pèrdua de pes (Riddle, 2002).

2.2.2.2. TRACTAMENT DELS FACTORS DE RISC ASSOCIATS A LA SÍNDROME METABÒLICA

L'aterosclerosi, especialment quan afecta les artèries coronàries, és una causa important de morbiditat i mortalitat en pacients obesos i en diabètics de tipus 2. La diabetis magnifica el risc cardiovascular, no només per la hiperglucèmia crònica sinó perquè es pot presentar hipertensió arterial i dislipidèmies, augment dels nivells d'àcids grassos lliures, de triacilglicerols, colesterol-LDL colesterol i disminució dels nivells del colesterol-HDL.

A més dels canvis en l'estil de vida, es considera convenient aplicar una teràpia farmacològica que redueixi els factors de risc associats a l'obesitat i la diabetis, com són els agents antihipertensius i hipolipidèmics.

Hipertensió

Un rigorós control de la tensió disminueix significativament el risc cardiovascular. Els diürètics, β -bloquejants, inhibidors de l'enzim conversor de l'angiotensina, antagonistes del receptor de l'angiotensina o antagonistes dels canals de calci són els principals grups de fàrmacs utilitzats per la reducció de la pressió arterial (Kjeldsen et al., 2000). Els β -bloquejants provoquen sovint un augment del pes corporal, sent els inhibidors de l'enzim conversor de

l'angiotensina o els antagonistes del receptor de l'angiotensina la millor opció de tractament per l'individu obès.

Dislipidèmia

Les alteracions lipídiques, com l'augment dels triacilglicerols, de l'apo B, del colesterol-LDL, i la disminució del colesterol-HDL, són característiques del desenvolupament de la síndrome metabòlica, jugant un paper clau en els processos d'aterogènesi. La utilització d'inhibidors de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzim A reductasa, enzim clau en la síntesi de colesterol, com les estatines, redueix a la meitat els episodis coronaris en pacients diabètics amb hipercolesterolèmia (Pyörälä et al., 1997). Per altre banda, els fibrats també mostren el seu potencial beneficiós millorant els nivells de colesterol-HDL i disminuint els triacilglicerols plasmàtics.

Estat protrombòtic

Els increments del fibrinogen, del PAI-1 i d'altres promotors de la coagulació són components de la síndrome metabòlica associats a un risc elevat de trombosi arterial. En els pacients amb síndrome metabòlica, la pro-profilaxi amb baixes dosis d'aspirina o d'altres fàrmacs antiplaquetaris es considera una bona opció terapèutica per mitigar el risc d'esdeveniments cardiovasculars (Colwell, 2004; Pearson et al., 2002). En casos de risc més elevat es recorreix al tractament amb anticoagulants (heparina) o disminució crònica de la capacitat de coagulació amb antivítamina K (warfarina, o cumarines com l'acenocumarol) per evitar episodis d'íctus provocats per l'alteració del ritme cardíac associat amb la síndrome metabòlica.

Estat proinflamatori

L'estat pro-inflamatori, identificat per una elevació de les citoquines, IL-6 i $TNF\alpha$; així com dels reactants de fase aguda, proteïna C reactiva i fibrinogen; està associat a un elevat risc de desenvolupar malaltia cardiovascular i diabetis (Pearson et al., 2003). Canvis de l'estil de vida i una reducció substancial del pes poden ser suficients per reduir la concentració d'aquests marcadors pro-inflamatoris i reduir així el risc que reflecteixen (Van Dielen et al., 2004). No existeix ara mateix un tractament farmacològic antiinflamatori específic, però si que alguns dels fàrmacs utilitzats pel tractament dels altres factors de risc metabòlics, com les estatines, els fibrats o les tiazolidinadions, presenten una reducció dels nivells de proteïna C reactiva associada al seu tractament (Jialal et al., 2001; Nesto, 2004).

3. OLEOÏL-ESTRONA

3.1. L'OLEOÏL-ESTRONA, SENYAL DE REGULACIÓ DEL PES CORPORAL

Dels diferents models postulats per explicar el mecanisme que regula el pes corporal, un dels més àmpliament acceptats és el model lipostàtic proposat per Kennedy, en el que es considera que les reserves grasses de l'organisme es mantenen constants, de manera que qualsevol desviació del nivell òptim produeix un canvi compensatori controlat per l'hipotàlem. Aquest sistema implicaria l'existència d'un senyal de ponderostat o lipostat, sintetitzat i alliberat en proporció a la massa grassa, que informaria els centres de control del pes corporal del cervell de la quantitat de reserves grasses que té l'organisme per tal de mantenir-ne l'homeòstasi. Amb aquesta informació els centres hipotalàmics regularien la ingestió d'aliment, la termogènesi i l'ambient hormonal per tal de disminuir o augmentar la quantitat de reserves grasses de l'organisme (Kennedy, 1953).

Basant-se en aquest model, el nostre grup d'investigació es va endinsar a la recerca d'aquest senyal de ponderostat. Aquest senyal, sintetitzat en proporció a la massa grassa de l'organisme, hauria de ser capaç de travessar fàcilment la barrera hematoencefàlica i de tenir una vida mitja prou llarga per permetre ajustaments a llarg termini. Aquestes premisses van fer descartar ràpidament els pèptids i les proteïnes, ja que tenen una vida mitja en plasma curta i no travessen fàcilment la barrera hematoencefàlica; també exclouïa les molècules molt petites, com la glucosa, el glicerol o els aminoàcids ja que aquests es modulen per l'estat metabòlic i no podrien dur a terme efectes a llarg termini. Les hormones esteroïdals, en canvi podrien ser bones candidates a senyal de ponderostat degut a la seva estabilitat, lipofília i capacitat de penetració al cervell i les cèl·lules. Moltes es sintetitzen i modulen al propi cervell, com els neuroesteroides (Belelli et al., 2005); i els seus efectes es poden mantenir a mig o llarg termini gràcies al seu mecanisme d'acció que comporta la síntesi de proteïnes i que transmet el senyal gràcies a receptors nuclears (Walters, 1985), molts d'ells considerats "orfes", dels que encara no es coneix la funció ni els lligands (Enmark et al., 1996; Soontjens et al., 1996). Cal, a més afegir que moltes hormones esteroïdals es troben fortament implicades en el sistema de control del pes corporal (Remesar et al., 1993).

En un principi, el nostre grup va centrar els estudis en l'estrona com a possible senyal de ponderostat, però posteriorment es va descartar en veure que tenia efectes clarament anabòlics que afavorien la deposició de greix (Lobo et al., 1993). A partir de l'observació que algunes de les hormones esteroïdals es troben a lipoproteïnes i al teixit adipós esterificades amb àcids grassos (De la Torre et al., 1995; Pahuja i Hochberg, 1989); el que s'havia interpretat com una forma d'emmagatzematge per tal de poder ser alliberades a llarg termini; es va plantejar la possibilitat que l'estrona es trobés majoritàriament esterificada. Aquesta estrona esterificada circularia en sang unida a lipoproteïnes, principalment les d'alta densitat (HDL), per la seva

capacitat de transportar el colesterol dels teixits perifèrics fins al fetge, constituint un mitjà de transport ideal per una molècula tant lipòfila i estable com un èster d'estrona. Per fer les primeres proves, es va sintetitzar un èster d'estrona amb àcid oleic, per ser l'àcid gras majoritari en el teixit adipós de la rata (Rafecas et al., 1992). Es va sintetitzar, doncs, l'oleoil-3-estrona (OE) que va ser administrada a rates normals en forma d'emulsió lipídica mitjançant una infusió constant. Immediatament es va observar una pèrdua de pes dosi-depenent (Sanchis et al., 1996). La marcada disminució de pes corporal sense efectes secundaris aparents va semblar "màgica", i d'aquí esdevingué el nom de *Merlín* pel que es van conèixer inicialment les seves preparacions i compostos.

L'estudi de l'OE com a base d'una futura teràpia farmacològica per l'obesitat es basa doncs, en la hipòtesi que l'OE és una senyal de ponderostat encarregat d'informar el sistema nerviós central de la quantitat de reserves grasses de l'organisme. Amb aquesta hipòtesi de base, s'han realitzat al llarg dels últims 10 anys nombrosos estudis per tal d'esbrinar quins són els mecanismes d'acció d'aquesta molècula i per conèixer quins són els efectes del tractament amb OE sobre l'organisme, comprovant els possibles efectes secundaris que pogués tenir i la forma més eficient d'administració per tal que el tractament resultés òptim.

3.1.1. ESTRUCTURA DE L'OE

L'OE és un èster d'estrona amb unes característiques estructurals que li confereixen una naturalesa molt lipòfila. Estudis en paral·lel amb diferents anàlegs de l'OE han demostrat que els seus efectes sobre el pes corporal i la ingesta depenen d'una sèrie de dominis estructurals que són necessaris perquè la molècula dugui a terme la seva funció (Sanchis et al., 1998). Probablement, la preservació d'aquestes regions de la molècula sigui necessària per la interacció amb el seu receptor fisiològic.

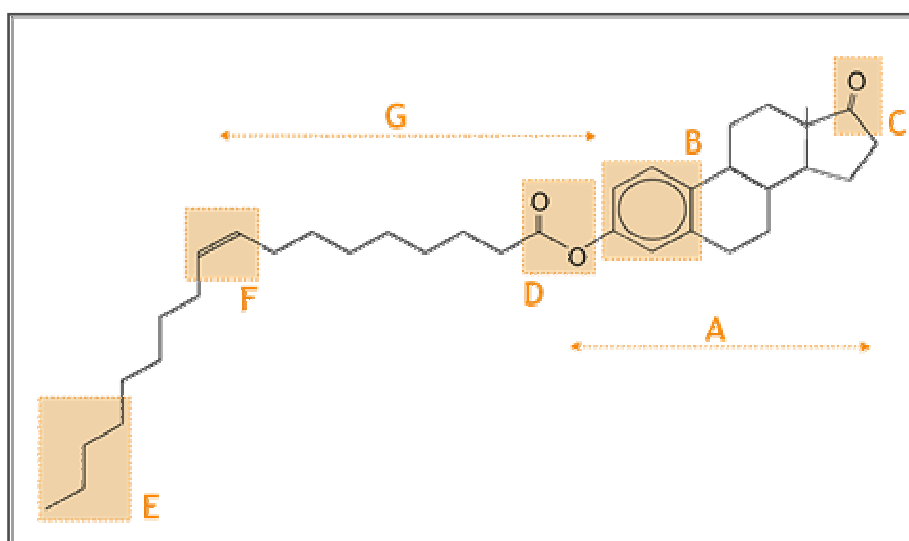


Figura 6. Dominis estructurals que confereixen a l'OE la capacitat de dur a terme els seus efectes sobre el pes corporal i la regulació de la ingestió d'aliment (Sanchis et al., 1998).

El nucli esteroide no sembla que intervingui en la interacció amb el receptor, però sí que és necessari per mantenir l'estructura espacial de la molècula (A). L'anell aromàtic de l'estrone (B) i l'enllaç èster (D) són necessaris per la seva efectivitat, així com també ho és que l'anell D tingui una funció oxigenada orientada en el mateix pla que el nucli esteroïdal (C). La presència d'un àcid gras de cadena llarga (E) és realment imprescindible, tot i que també hi ha un límit per aquesta llargada. L'efectivitat disminueix en eliminar el doble enllaç en cis de l'àcid gras (F), i la distància entre aquest enllaç i el nucli esteroide (G) també sembla ser crítica (Figura 6).

3.2. EFECTES DE L'OE

3.2.1. EFECTES SOBRE EL PES CORPORAL I EL METABOLISME ENERGÈTIC

L'administració d'OE induïx una pèrdua del pes corporal deguda a una disminució de la ingestió d'aliment mantenint la despesa energètica a un nivell més elevat del que correspondria a la ingestió d'aliment (Sanchis et al., 1997a). D'aquesta manera es trenca el primer nivell de defensa de les reserves grasses per contrarregulació, generant-se un balanç energètic negatiu que és cobert essencialment amb les reserves lipídiques, conservant-se la proteïna corporal (Sanchis et al., 1996; Balada et al., 1997a).

Aquests efectes de l'OE depenen tant de la via d'administració com de la dosi administrada. En els primers experiments realitzats en animals d'experimentació, l'OE s'administrava mitjançant una infusió intravenosa contínua utilitzant minibombes osmòtiques que s'implantaven subcutàniament a l'esquena de l'animal i que alliberaven l'OE incorporat en liposomes a la vena cava amb un flux constant de 5µl/h durant dues setmanes (Sanchis et al., 1996). Posteriorment, i per minimitzar els possibles efectes estrogènics del tractament amb OE es va estudiar la possibilitat d'administrar-la per via oral. En un principi, l'OE va ser administrat com a suplement en una dieta hiperlipídica, aconseguint una potenciació dels seus efectes aprimadors (Remesar et al., 2000; López-Martí et al., 2000). El problema era que la dosi administrada variava en funció de l'aliment consumit. Finalment, es va optar per l'administració oral mitjançant sonda intragàstrica (Grasa et al., 2001a), per ser una via d'administració menys invasiva, més ràpida i més fàcilment traduïble al tractament dels humans. En aquest cas, l'OE s'administrava als animals utilitzant com a vehicle l'oli de girasol. De tots els vehicles estudiats aquest era el que presentava una millor resposta al tractament. En tots els casos el tractament amb OE produïa un efecte aprimador, però va ser amb l'administració mitjançant sonda intragàstrica que es va aconseguir una resposta lineal de la variació del pes corporal, de la massa de greix i de l'energia total emmagatzemada en l'animal.

Com s'ha comentat anteriorment, els efectes de l'OE sobre la massa de greix i l'energia corporal són dependents de la dosi, tant en el tractament intravenós com l'oral. Els estudis dosi-efecte amb l'OE van demostrar una pèrdua de gana en l'animal tractat que provoca una

disminució de la ingestió d'aliment de manera dosi-depenent (Grasa et al., 2001a). Aquests estudis van permetre establir, en el tractament oral, una correlació lineal en un rang de dosis entre 0.2 i 20 $\mu\text{mols/kg.dia}$. Finalment, es va establir la dosi de 10 $\mu\text{mols/kg.dia}$, durant 10 dies, com la dosi estàndard amb la que realitzar posteriorment la caracterització dels efectes de l'OE a l'organisme per via oral.

En estudis presentats recentment per un altre grup de recerca, l'OE administrat centralment mitjançant microinjeccions intracerebroventriculars va produir una reducció significativa tant de la ingestió d'aliment com del pes corporal, també de manera dosi depenent (Vasselli et al., 2007). Aquestes dades indiquen que als ja demostrats efectes perifèrics antilipogènics, cal afegir que l'OE actua centralment inhibint la gana i reduint el pes corporal dels animals d'experimentació.

Els efectes de l'OE sobre el pes corporal s'han estudiat en diferents models animals: rates primes de diferents soques (Wistar, Zucker); rates obeses, tant genèticament (Zucker *fa/fa*) (Balada et al., 1997a) com induïda per la dieta (Balada et al., 1997b; Remesar et al., 2000); i ratolins obesos genèticament (*ob/ob*, *db/db*) (Grasa et al., 2000). També s'han estudiat les diferències de resposta a l'administració d'OE tant en mascles com en femelles, on s'ha observat que els mascles són més sensibles al tractament i, per tant, perden més pes que les femelles sota les mateixes condicions (Grasa et al., 2001b).

Fins que no es van iniciar els assajos clínics amb l'OE, les úniques dades dels efectes de l'OE en humans eren d'un únic pacient obès, que voluntàriament es va autoadministrar l'OE en 10 períodes consecutius de 21 dies de tractament seguits en cada cas de períodes de descans de com a mínim 2 mesos de durada. La pèrdua de pes associada al tractament va fer disminuir l'índex de massa corporal del pacient en 10 unitats (Alemany et al., 2003). En els estudis clínics de fase I l'OE presenta una bona tolerància a tots els nivells de dosi estudiats. L'OE administrat com a una única dosi diària durant una setmana presenta els mateixos efectes beneficiosos ja observats en els estudis preclínics. Els pacients obesos tractats durant una setmana amb OE experimenten una disminució del desig de menjar, una reducció de la gana i una pèrdua de pes generalitzada respecte el grup placebo, que continua manifestant-se passats 28 dies de l'inici del tractament (Tejura et al., 2005). Aquestes dades donen suport a la hipòtesi inicial de l'oleoil-estrona com a senyal de ponderostat, basant el seu mecanisme d'acció en el reajustament del pes corporal fixat.

La pèrdua de gana induïda per l'oleoil-estrona és encara un fenomen no explicat. La ingestió d'aliment dels animals tractats intravenosament experimenta una davallada progressiva que s'atura entre el quart i sisè dia del tractament recuperant-se en alguns casos els nivells normals de consum als 10 dies de l'inici del tractament. Tot i així, el pes dels animals baixava fins als 10 dies mantenint-se constant la resta del tractament. Un mes després d'aturar el tractament, els animals prims mantenien el seu pes per sota del pes inicial, mentre que els animals obesos

recuperaven el ritme d'increment de pes dels seus controls però, mantenint la diferència de pes establerta durant el període de tractament (Adán et al., 1999a).

Experiments fets amb animals alimentats amb una dieta de cafeteria simplificada (galletes amb paté, bacon, plàtan, llet ensucrada, pinso i aigua), en la que els animals poden triar entre els diferents aliment, s'ha comprovat que el tractament amb l'OE induïx una pèrdua d'apetència selectiva pels glúcids, i en especial pels sucres, sense disminuir pràcticament la quantitat de lípids i de proteïna ingerits respecte els controls (Balada et al., 1997b).

El consum d'oxigen i la taxa metabòlica dels animals tractats amb OE es manté pràcticament al mateix nivell que la dels animals control (Sanchis et al., 1997a), de manera que supera amb escreix la despesa energètica necessària per a oxidar l'aliment ingerit. D'altra banda, el fet de que no es produeixin canvis importants en l'expressió de les UCP en el teixit adipós per efecte de l'oleoïl-estrona (Sanchis et al., 1997a; Yubero et al., 2001) i, per tant, que es mantingui la termogènesi, provoca com a resultat final un balanç energètic negatiu que es tradueix en una marcada pèrdua de pes.

3.2.2. EFECTES SOBRE ELS PARÀMETRES PLASMÀTICS

La disminució de les reserves lipídiques causada per l'OE va acompanyada d'una sèrie de canvis de paràmetres plasmàtics, indicadors d'un efecte de l'OE tant en el metabolisme lipídic com glucídic, ja sigui amb el tractament oral com intravenós.

Malgrat el drenatge energètic que provoca el tractament amb OE, els nivells circulants de glucosa es mantenen dins de la normalitat; fins i tot s'observa un increment del glicogen hepàtic causat en part per l'increment en la sensibilitat a la insulina, encara que disminueixin els nivells circulants d'aquesta (Sanchis et al., 1997). No s'observen efectes significatius de l'oleoïl-estrona sobre la glucèmia dels animals amb un pes normal que ja presenten un valor de glucosa circulants dins de la normalitat (Balada et al., 1997a). En canvi, en les rates Zucker *fa/fa*, utilitzades com a model de prediabetis tipus 2, l'administració d'OE induïx una forta caiguda de la glucèmia, fins als valors normals, acompanyada d'un espectacular descens de la insulina. Paradoxalment, en aquests animals, que es troben en un context de mobilització massiva dels greixos, es conserva el glicogen hepàtic (Adan et al., 1999b). Així, l'OE normalitza els nivells de glucosa plasmàtics, reduint aquells valors que es trobin per sobre de la normalitat sense produir hipoglucèmia en els animals inicialment normoglucèmics.

La reducció de la resistència a la insulina provocada per l'OE a dosis farmacològiques és molt marcada. D'aquesta manera, la disminució que experimenten els nivells d'insulina circulants són deguts a la baixada de la resistència a la insulina i a la millora de la sensibilitat a aquesta dels teixits perifèrics, així que encara que es segregui menys quantitat de insulina al torrent sanguini s'aconsegueix normalitzar la glucèmia (Grasa et al., 2001b)

L'efecte de l'OE sobre la mobilització dels lípids depèn de la quantitat de reserves lipídiques de què disposa l'animal, que d'altra banda està relacionada també amb l'estat insulínic i el seu funcionament. Així doncs, rates amb diabetis de tipus 1 provocada per l'administració d'estreptozotocina, que tenen molt poques reserves lipídiques, no poden perdre tant teixit adipós (no el tenen) i mobilitzen parcialment la proteïna corporal per mantenir la despesa energètica. El model de rata diabètica de tipus 2 Goto-Kakizaki, en canvi, respon al tractament amb OE d'una manera similar a les rates obeses Zucker *fa/fa*, suggerint doncs, que els efectes de l'OE es veuen alterats per la manca d'insulina plasmàtica (diabetis de tipus 1), cosa que no succeeix en resistència a la insulina (diabetis de tipus 2) (Díaz-Silva et al., 2003).

D'altra banda, l'OE no sols incrementa la sensibilitat a la insulina, sinó que també potencia la resposta insulínica a una sobrecàrrega oral de glucosa en rates obeses. La resposta de la insulina a l'arribada de la glucosa, experimenta un fort pic ja a als 10 minuts després de rebre la sobrecàrrega oral, mantenint-se fins al final una resposta més marcada que la dels controls; els nivells de glucosa dels animals tractats es mantenen per sota dels controls durant una hora (Cabot et al., 2002).

S'ha observat que l'increment dels nivells de TNF α en rates canceroses o tractades amb aquesta citoquina porta associat un descens dels nivells de l'oleoil-estrona (Massanés et al., 1998), fet que reforça encara més el paper antagònic de l'OE amb els agents que tendeixen a induir, mantenir o potenciar la resistència a la insulina. Tots els efectes observats en l'administració de l'oleoil-estrona confirmen la potencialitat de l'OE com a possible teràpia per corregir la resistència a la insulina pròpia de la diabetis de tipus 2.

Els canvis en el metabolisme lipídic provocats per l'OE també són clau per entendre el funcionament de l'oleoil-estrona. Tot i la dràstica mobilització de les reserves lipídiques que provoca el tractament, ni els nivells d'àcids grassos lliures ni de triacilglicerols es veuen afectats significativament en animals normals. En canvi, si que s'observa una important davallada del colesterol plasmàtic, deguda en gran part al colesterol provinent de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) (Blay et al., 2002). Aquests resultats s'observen tant en mascles com femelles, i també amb els tractaments realitzats amb dieta hiperlipídica (López-Martí et al., 2000). En les rates Zucker *fa/fa* sí que troben una marcada disminució de la hiperlipèmia i hipercolesterolèmia que són rebaixades fins a assolir valors normals. Aquesta caiguda es produeix en paral·lel a un marcat augment de l'activitat lipoproteïna lipasa muscular i plasmàtica i una disminució global de l'activitat lipasa tant en fetge com en teixit adipós (Blay et al., 2002). També s'ha observat que a curt termini, l'OE accelera el recanvi de colesterol esterificat, amb una disminució significativa de la seva vida mitja en plasma a les 6 hores d'haver-se iniciat el tractament, i que encara és més marcada a les 72 hores (Cabot et al., 2005).

L'OE no provoca increments en els nivells dels cossos cetònics, però propicia una lleugera davallada de la urea plasmàtica, que indica una disminució de l'oxidació proteica (la davallada

de la ingestió d'aliment aporta menys proteïna de la dieta per oxidar), preservant la proteïna corporal a canvi d'afavorir el catabolisme lipídic (Sanchis et al., 1997b; Grasa et al., 2001a).

En els estudis amb humans, l'OE presenta els mateixos efectes beneficiosos observats en els animals d'experimentació. Així es produeix una normalització de la glucosa plasmàtica, reducció dels nivells de colesterol-LDL i un augment dels de colesterol-HDL, millorant la relació colesterol LDL:HDL fins i tot en les dosis més baixes. S'observa un lleuger augment dosi-depenent i reversible dels nivells d'estrone i estradiol, així com una baixada de la testosterona, que ràpidament retornen al nivell basal 8 dies després d'aturar el tractament (Alemany et al., 2003; Tejura et al., 2005). Aquests resultats fan de l'oleoil-estrone, no només un possible fàrmac pel tractament de l'obesitat, sinó un candidat adequat pel tractament de la síndrome metabòlica i les complicacions que hi estan associades.

3.2.3. EFECTES SOBRE EL TEIXIT ADIPÓS BLANC

Bona part dels efectes de l'oleoil-estrone sobre l'organisme es centren al teixit adipós blanc. La pèrdua de lípids corporals està estretament correlacionada amb la dosi d'OE administrada (Grasa et al., 2001a).

Tots els dipòsits de teixit adipós blanc estudiats en la rata disminueixen el seu pes entre un 20 i un 40 % després del tractament oral durant 10 dies (Remesar et al., 2002). La localització més afectada és el teixit adipós mesentèric i amb poca diferència el segueix el cordó retroperitoneal o lumbar. Aquesta reducció de pes tissular és deguda tant a la pèrdua de massa cel·lular com a la reducció del nombre de cèl·lules del teixit. La localització on més es redueix la massa cel·lular del teixit adipós és la gluteal i la subcutània, mentre que en el cas dels dipòsits epididimal i mesentèric trobem una reducció del nombre de cèl·lules amb el tractament (Remesar et al., 2002).

Estudis de microscòpia òptica demostren que els adipòcits procedents de talls histològics de teixit adipós blanc subcutani i periovàric de rates tractades amb OE durant 14 dies per via intravenosa, presenten una reducció d'aproximadament $\frac{1}{4}$ del volum cel·lular respecte dels adipòcits d'animals no tractats (Cabot et al., 2000).

La massiva mobilització lipídica observada en els animals tractats amb l'oleoil-estrone podria ser explicada, en part per l'estimulació de les vies adrenèrgiques, ja que l'OE incrementa moderadament l'expressió dels receptors β adrenèrgics en els teixits adiposos. El receptor β_1 incrementa la seva expressió en teixit adipós blanc subcutani, el β_2 i β_3 en periovàric i el β_3 en teixit adipós marró. El β_3 disminueix en canvi en TAB subcutani per efecte de l'OE (Cabot et al., 2001a). També, els adipòcits aïllats de teixit adipós blanc periovàric de rates tractades durant 14 dies per via intravenosa, són més sensibles a l'estimulació adrenèrgica causada per una agonista adrenèrgic (isoproterenol), i per tant produeixen més AMPc que els animals controls. Així doncs, sembla que el tractament amb OE podria estimular els mecanismes adrenèrgics, si

més no, incrementant la capacitat de resposta als agonistes, desencadenant així una resposta més potent que donaria lloc a més activitat lipolítica (Cabot et al., 2001a).

Com s'ha comentat anteriorment, l'efecte de l'OE en certes localitzacions adiposes es troba lligat a una reducció del nombre de cèl·lules, fet que ha fet pensar en una possible activació de les vies apoptòtiques o de mort cel·lular programada en aquest teixit. La reducció del contingut d'ADN en algunes localitzacions de rates tractades amb OE, pot ser considerada un clar indicador d'apoptosi (Remesar et al., 2002; Salas et al., 2007). Altres observacions a favor d'aquesta hipòtesi són que a les 48 hores de l'administració d'OE trobem un increment de l'expressió de Bax i caspasa 3 al teixit adipós periovaric, que indiquen una activació apoptòtica per la via intrínseca; i que al mesentèric, l'OE indueix una mort cel·lular programada, activada per la via dels receptors de mort cel·lular i amplificada per la via intrínseca. En aquest teixit trobem un augment de l'expressió de caspasa 3, caspasa 8, Bid i Bax (Salas et al., 2007).

El teixit adipós no només és el principal òrgan diana dels efectes de l'OE, sinó que també n'és l'òrgan responsable de la seva síntesi. Estudis *in vitro* demostren com les cèl·lules adiposes en cultiu (3T3-L1) incubades en presència d'estrone lliure incorporen aquesta hormona transformant-la ràpidament a oleoil-estrone (Esteve et al., 1999). La síntesi i emmagatzemament de l'OE a l'adipòcit estan regulats tant a nivell de la captació d'estrone lliure com a nivell de la pròpia síntesi d'OE a partir de l'estrone captada. En aquesta regulació hi juguen un paper molt important tres hormones molt relacionades amb el metabolisme del TAB: la insulina que inhibeix tant la captació d'estrone com la síntesi d'OE, la leptina i la corticosterona, totes dues estimulants de la síntesi intracel·lular d'OE de manera dosi- i temps-depenent (Esteve et al., 2001a).

3.3. DISTRIBUCIÓ I NIVELLS D'OE

La major part de l'estrone corporal es troba esterificada en forma d'OE, acumulada sobre tot a la massa grassa del teixit adipós blanc, amb nivells d'estrone lliure molt més baixos. En els humans, els valors circulants d'OE són proporcionals a la massa de greix i l'IMC, una correlació que es trenca en l'obesitat mòrbida, on els valors no són molt diferents dels de les persones amb normopes (Fernández-Real et al., 1999). En rates, s'observa el mateix fenomen: les rates Zucker *fa/fa* presenten valors d'OE en el mateix rang que les rates amb normopes (Adán et al., 1999a), el que es tradueix en valors circulants d'oleoil-estrone que no són proporcionals a la seva massa grassa. Aquestes dades permeten postular que l'obesitat comporta un dèficit d'OE, reforçant el seu possible paper com a senyal de ponderostat i el seu us farmacològic per tal de normalitzar el contingut de reserves de greix de l'organisme.

L'OE plasmàtica viatja unida a lipoproteïnes, principalment a la fracció HDL. Tot i això, les concentracions d'OE en les lipoproteïnes són baixes si les comparem amb d'altres molècules lipídiques (Virgili et al., 1999). Quan s'administra una dosi oral d'oleoil-estrone a una rata

Zucker amb normopes i es fa un seguiment de l'hormona a l'organisme, podem veure com gran part de l'OE que arriba al lumen intestinal és absorbida com a tal, i només una petita part s'hidrolitza i s'absorbeix com estrona lliure. Les dues principals formes d'entrada de l'OE al cos són per transferència intestinal a les HDL (75%) o carregada en quilomicra a través de la limfa. L'OE travessa la paret del tracte digestiu i és carregada pràcticament intacta a les lipoproteïnes plasmàtiques (Esteve et al., 2001b). Possiblement existeixin mecanismes específics que permetin la carrega de la molècula a les HDL circulants, però encara no se'n coneixen més detalls. La major part de l'OE absorbit i carregat a les HDL passa inalterat a través del fetge, mentre que degut a la capacitat del fetge de retenir i processar els remanents de quilomicra (Havel, 1998), l'oleoil-estrona d'aquests es destruïda. L'estrona lliure resultant és ràpidament transformada a èsters hidrofílics d'estrona, principalment estrona sulfat, ja que el fetge és el principal lloc de conjugació d'estrògens amb sulfat (Hernández et al., 1992), ciclant-se a través de la per circulació enterohepàtica de manera similar a la descrita pels àcids biliars (Sjövall, 2004). Per tant, al fetge trobem la principal barrera per evitar que l'estrona lliure que es genera per la hidròlisi de l'OE, o que s'ingereix en la dieta, actuï promovent el creixement i la seva acumulació als teixits. L'existència d'aquest sistema d'eliminació tant efectiu permet observar una bona eficàcia en l'administració oral de l'OE, sense increments en els nivells d'estrona i, per tant, amb escassos efectes derivats d'aquesta (Massanés et al., 2003). Un problema en el funcionament hepàtic podria causar doncs, obesitat induïda per l'estrona (Esteve et al., 2001b), tenint en compte que aquesta està present en la majoria dels aliment que constitueixen la nostra dieta (Remesar et al., 1999).

Pel que fa a la distribució de l'OE en els teixits, si injectem i.v. l'oleoil-estrona en liposomes marcada amb triti, passats 10 minuts l'hormona desapareix ràpidament del corrent circulatori trobant-se la màxima concentració al fetge. Els teixits adiposos no capten més que un 10 % de l'OE administrat. L'eficiència d'hidròlisi dels teixits és molt marcada, raó per la qual, l'administració intravenosa d'OE en liposomes resulta molt estrogènica pels alts nivells d'estrona lliure generats amb el tractament (Sanchis et al., 1997). La distribució del marcatge entre animals prims i obesos presenta diferències significatives. Els animals obesos retenen més OE en plasma del que retenen els animals amb normopes, que ràpidament transfereixen el marcatge a l'interior dels teixits. Aquesta captació diferent d'OE entre els animals obesos i amb normopes suggereix una alteració en el mecanisme de regulació del recanvi o disponibilitat de l'OE en l'obesitat genètica (Balada et al., 1998).

En canvi, l'administració oral d'OE marcada radioactivament ens mostra una distribució tissular diferent. Una hora després d'haver estat administrada l'hormona, aquesta es troba repartida en una tercera part en teixits (principalment a la sang) i la resta roman a l'intestí pràcticament inalterada. L'OE es troba present principalment en estómac, intestí, fetge, múscul esquelètic i teixit adipós. L'hipotàlem també mostra una forta captació d'OE per gram de teixit si

la comparem amb la resta del cervell (Esteve et al., 2001b), fet que recolza la idea que l'OE funcioni com a senyal de ponderostat (Adán et al., 1999a).

El dejuni també afecta els nivells d'OE, igual que en el cas del contingut lipídic de l'animal, però en diferent grau. Així, mentre un dejuni de 48 hores en una rata arriba a reduir en un 25% el seu contingut de lípids, els nivells d'OE només disminueixen un 13%; tot i que si es té en compte el total de la massa circulant d'OE el dejuni provoca una davallada del mateix ordre que el contingut lipídic de l'animal (Vilà et al., 1999).

3.4. MECANISME D'ACCIÓ DE L'OE

Després de més deu anys d'investigació sobre els efectes de l'administració de l'oleoil-estrona, el nostre grup segueix immers en la recerca del seu precís mecanisme d'acció. Els efectes aprimadors de l'OE suggereixen una possible interacció amb altres components que també exerceixen els seus efectes sobre el pes corporal, com ara la leptina, la insulina, els glucocorticoides o l'estrona.

Pel que fa a la leptina, el tractament amb l'OE provoca una forta davallada tant en els nivells circulants de leptina (Adán et al., 1999b; Grasa et al., 2001a), com en els nivells tissulars (Remesar et al., 2002), així com en l'expressió del gen *Lep* en el teixit adipós (Sanchis et al., 1997a; Adán et al., 1999b). Aquest últim efecte també s'ha observat en cultius d'adipòcits, confirmant que és un efecte directe de l'OE independent de l'acció d'altres hormones, com poden ser les catecolamines (Fritsche et al., 1998; Li et al., 1997). Pel contrari, en rates Zucker *fa/fa* no es produeix aquesta inhibició de l'expressió del gen *Lep* per l'oleoil-estrona (Adán et al., 1999b), el que implica que cal la plena funcionalitat del receptor de leptina perquè pugui donar-se l'efecte repressor. El fet de que l'OE faci perdre pes tant a les rates Zucker *fa/fa*, com als ratolins *db/db* i *ob/ob*, tots amb un sistema de la leptina deficient, confirma que l'oleoil-estrona pot actuar en absència de leptina, i que per tant aquesta no participa en la senyalització dels efectes de l'OE sobre el pes corporal. Cal assenyalar, que s'ha observat que la leptina sí que modula la síntesi d'oleoil-estrona d'una manera dosi-dependent, almenys *in vitro* (Esteve et al., 1999). S'ha postulat que en rates obeses, i probablement en humans obesos, amb resistència a la leptina, els baixos nivells circulants d'OE podrien ser conseqüència de la incapacitat de la leptina per actuar sobre el sistema d'esterificació de l'estrona. A més, al disminuir els nivells d'OE disminueix la seva acció inhibidora sobre l'expressió de la leptina, fent incrementar encara més els seus nivells.

En l'estudi de la relació de l'OE amb els glucocorticoides, podem dir que aquests presenten un paper de contrarreguladores dels efectes de l'OE, amb la funció de corregir els excessos metabòlics induïts per la sobreproducció d'OE (Sanchis et al., 1997), igual que passa amb la leptina (Zakrzewska et al., 1997). El tractament intravenós amb OE provoca un increment molt marcat dels nivells de corticotropina (ACTH) i corticosterona, acompanyats d'una disminució de

l'expressió hepàtica de la globulina lligadora de glucocorticoides (CBG) i una menor capacitat d'unió de corticosterona en tots els teixits estudiats (Grasa et al., 1998a). L'adrenalectomia induïx una dràstica potenciació dels efectes de l'OE, fins al punt que s'arriba a un fracàs en l'homeòstasi metabòlica amb una forta pèrdua de les reserves energètiques i de la massa proteica (Grasa et al., 1998b). Probablement aquests efectes dels glucocorticoides puguin ser interpretats com una resposta a la massiva pèrdua de reserves grasses que provoca el tractament, realitzant així el seu paper protector en la alteració del balanç energètic. Molt recentment, la forta disminució dels efectes aprimadors del tractament intravenós de l'OE pels glucocorticoides ha estat confirmada pel tractament oral (Grasa et al., 2007).

Els efectes de l'estrone sobre el pes corporal són oposats als de l'OE. En rates, l'administració crònica intravenosa d'estrone provoca un increment del pes en els animals (Sanchis et al., 1996). També s'ha vist que les rates Zucker obeses *fa/fa* presenten uns nivells plasmàtics d'estrone més elevats que les rates primes (Esteve et al., 1999). Aquestes observacions es confirmen en els humans obesos respecte als humans amb normopes (Ardèvol et al., 1997), recolzant el paper de l'estrone com un dels principals factors inductors de l'obesitat. S'ha observat una disminució dels nivells plasmàtics d'estrone, tant en rates primes com obeses, després del tractament amb OE (Adán et al., 1999a; 1999b).

La diferència entre els efectes anabolitzants de l'estrone i els aprimadors de l'OE suggereix que el mecanisme d'acció de l'oleoil-estrone no està directament relacionat amb l'alliberament de l'estrone (Sanchis et al., 1996) i permet postular que l'equilibri entre ambdós compostos permet l'ajustament del ponderostat (Adán et al., 1999). Així, i d'acord amb aquest plantejament, una situació de baixes reserves de greix promouria la conversió d'OE a estrone per tal de promoure la deposició de greix. Pel contrari, un elevat contingut de greix a l'organisme incrementaria l'esterificació de l'estrone augmentant els nivells plasmàtics d'OE i promovent la pèrdua de pes per activació de la lipòlisi (Cabot et al., 2001a) i l'oxidació lipídica (Yubero et al., 2001). Segons aquest model, una exposició permanent a nivells elevats d'estrone podria trencar el balanç ponderostàtic estrone/oleoil-estrone induint obesitat.

Tot i el seu dèbil caràcter estrogènic i la seva baixa afinitat pels receptors d'estrògens, l'estrone es considera un estrogen. És per això que es va analitzar la possibilitat que l'OE pogués actuar a través dels receptors dels estrògens, bé per una acció directa de l'OE sobre el receptor, o mitjançant l'alliberament d'estrone o β -estradiol. Estudis cinètics de unió van posar de manifest que l'OE presenta una afinitat gairebé nul·la pel $ER\alpha$, al que l'estrone s'hi uneix amb afinitat relativament baixa i el β -estradiol ho fa amb gran afinitat (Figura 7) (Cabot et al., 2001b). Pel que fa als efectes estrogènics, el tractament intravenós amb OE provoca un increment del pes de l'úter i els ovaris junt amb una lleugera proliferació de la glàndula mamària, mentre que l'administració per via oral no induïx cap d'aquests efectes (Cabot et al., 2001b). Probablement aquest diferent comportament sigui degut a una acumulació d'estrone

amb el tractament intravenós que dona lloc a un increment significatiu en els nivells d'estradiol que seria el responsable últim dels efectes estrogènics del tractament intravenós. En canvi el tractament oral no provoca increment en els nivells circulants d'estrògens per la funció de filtrat o barrera del fetge respecte de tot el que passa per l'intestí i el sistema porta hepàtic, protegint així l'organisme dels efectes estrogènics indesitjables.

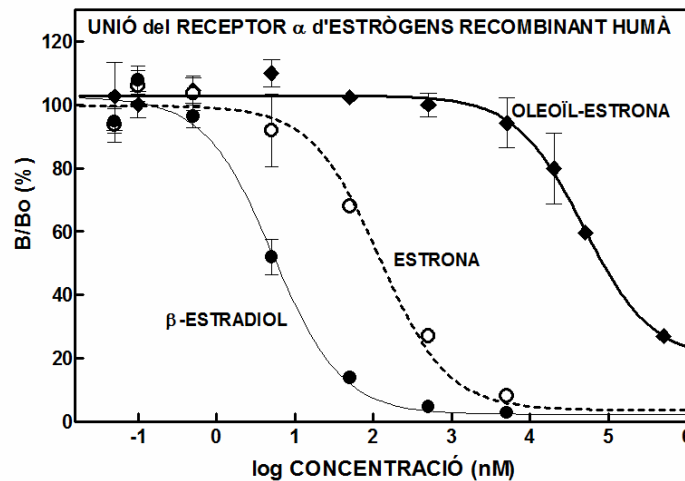


Figura 7. Corbes d'afinitat pel receptor d'estrògens α recombinant humà del β -estradiol, l'estrona i l'oleoil-estrona (Cabot et al, 2001b).

Els efectes de l'OE sobre la gana i la ingestió d'aliment no semblen estar mediatos directament pel neuropèptid Y, ja que no s'han observat canvis importants en els valors d'aquest pèptid en els nuclis hipotalàmics dels animals tractats amb OE intravenós, malgrat que tendeixen a disminuir en el nucli arquejat (Cabot et al., 1998a). Tampoc s'han observat canvis importants en els nivells de l'hormona alliberadora de corticotropina, encara que sí que s'ha vist que els seus nivells experimenten un pic als nuclis arquejat i lateral preòptic als 10 dies de tractament intravenós així com una pujada progressiva fins al final del tractament en els nuclis hipotalàmics paraventricular i ventromedial. El mateix tractament en animals obesos no altera els nivells de CRH en cap dels nuclis hipotalàmics. Aquests nivells en hipotàlem no tenen cap correlació amb els nivells circulants d'ACTH ni corticosterona, que marquen un pic màxim a dia 6 en animals amb normopes i a dia 10 en obesos. Els resultats indiquen doncs, que els efectes de l'OE sobre els nivells de glucocorticoides, no estan mitjançats necessàriament per la CRH dels nuclis hipotalàmics (Cabot et al., 1998b). A més, els canvis induïts en els nivells de la CRH requereixen d'un sistema leptinèrgic totalment funcional, ja que no s'observen en rates obeses Zucker fa/fa en que el receptor de la leptina és defectuós.

II. OBJECTIUS

Si bé el nostre grup d'investigació té una llarga experiència de treball amb l'oleoïl-estrona i ha estudiat a fons els efectes metabòlics del seu tractament, encara no coneix prou quin és el mecanisme específic mitjançant el qual aquests efectes són duts a terme. Així, un primer objectiu d'aquest treball ha estat la continuació dels estudis de caracterització dels efectes apimadors de l'oleoïl-estrona aprofundint en el coneixement del seu mecanisme d'acció. En segon lloc ens interessava fer un estudi de la modulació farmacològica dels efectes de l'OE quan es combina amb d'altres fàrmacs que actuen sobre la ingesta, la composició corporal i/o la millora de la resistència a la insulina. El disseny d'aquests experiments ens permetria un estudi simultani, per una banda de les possibles sinèrgies existents entre els tractaments combinats, així com de la seva seguretat; i per una altra banda, un abordatge indirecte, de fet complementari, de l'estudi del mecanisme d'acció de l'oleoïl-estrona.

ESTUDI DEL MECANISME D'ACCIÓ DE L'OLEOÏL-ESTRONA

Confirmació de l'acció per una via "no estrogènica" de l'oleoïl-estrona

Des del descobriment de l'oleoïl-estrona, el nostre grup va considerar la possibilitat que l'OE pogués dur a terme els seus efectes a través dels receptors d'estrògens, ja sigui per una acció directa de l'OE sobre els receptors, o mitjançant la unió de la possible estrona alliberada en la seva metabolització, suggerint la possibilitat que l'oleoïl-estrona simplement actués com un "transportador d'estrògens". En el primer treball, es va proposar **analitzar els efectes metabòlics de l'administració oral d'un ampli rang de dosis d'estrona**, que ens permetria l'estudi de les diferències en els efectes metabòlics entre aquesta i l'oleoïl-estrona. En el segon, **l'administració combinada a animals d'experimentació de l'oleoïl-estrona junt amb el tamoxifè**, un dels antagonistes dels receptors d'estrògens més àmpliament utilitzats, ens permetria comprovar una vegada més, i des d'una nova aproximació, si els efectes de l'OE sobre el balanç energètic es produeixen a través del receptor d'estrògens.

Estudi de la modulació de la ingesta per l'oleoïl-estrona

Per tal d'aprofundir una mica més en el mecanisme d'acció de l'oleoïl-estrona es va estudiar com aquesta modula la ingesta. Un dels punts claus en l'acció de l'oleoïl-estrona és la disminució de la ingesta observada tant en els animals d'experimentació com en els humans quan se'ls administra OE, i com aquests efectes s'observen ja en les primeres hores de tractament. En estudis previs s'havia observat que la reducció de la ingesta provocada pel tractament amb oleoïl-estrona no era mitjançada per canvis en els nivells hipotalàmics de dos dels principals neuropèptids implicats en la regulació de la gana, el NPY i la CRH (Cabot et al, 1998a, 1998b), el que significa que l'OE no és tant un supressor de la gana sinó que, més aviat actua com a inductor del sadollament. Així, el desconeixement del mecanisme mitjançant el qual l'oleoïl-estrona modula la gana i la ràpida aparició dels efectes de l'OE sobre la ingesta a

través d'una ràpida inducció de la sensació de sadollament ens va portar a **l'estudi dels efectes de l'oleoïl-estrona sobre l'expressió dels principals pèptids gastrointestinals moduladors de la ingesta a curt termini**: la ghrelina, únic senyal gastrointestinal orexigènic, i els pèptids intestinals inductors de sadollament, CCK, PYY i GLP-1.

ESTUDI DE LA MODULACIÓ FARMACOLÒGICA DELS EFECTES DE L'OLEOÏL-ESTRONA

Combinació de l'oleoïl-estrona amb altres agents aprimadors

El sistema de control de l'homeòstasi energètica de l'organisme és un sistema altament redundat, encarregat de l'activació de tota una sèrie de mecanismes compensatoris que actuen en resposta a l'alteració de les reserves de greix de l'organisme i en defensa d'un pes preestablert. Desafortunadament, pels què es volen aprimar, la tenacitat d'aquests mecanismes és molt efectiva davant de les pèrdues de pes, sent un sistema de control principalment concebut per la protecció i supervivència de l'individu, de manera que limita eficaçment l'eficiència de molts dels tractaments farmacològics per a perdre pes. Així, l'existència d'aquests mecanismes contrareguladors ha fet que actualment siguin cada cop més els qui postulen l'aplicació d'una teràpia farmacològica combinada per al tractament de l'obesitat.

Seguint aquesta línia, **la combinació de l'OE amb agents aprimadors de mecanisme d'acció conegut, com la sibutramina, la dexfenfluramina, la fentermina o el rimonabant** ens permetria trobar resposta a diferents plantejaments. Primer, la caracterització d'una possible teràpia combinada per al tractament de l'obesitat on era important també analitzar la seva seguretat; i segon, una aproximació indirecta al mecanisme d'acció de l'oleoïl-estrona, analitzant la possibilitat de vies d'acció totalment o parcialment compartides entre l'oleoïl-estrona i els diferents agents combinats.

Posteriorment, i basant-nos en la idea de que l'estratègia combinada d'un agent inhibidor de la ingesta i un agent termogènic probablement és una de les millors opcions per desenvolupar un exitós tractament farmacològic per l'obesitat es va decidir estudiar **la combinació de l'oleoïl-estrona amb l'agonista dels receptors $\beta 3$ adrenèrgics, CL316,243**. Davant de l'abordatge sobre els dos principals factors que determinen el balanç energètic, ingestió i despesa energètica, esperaríem trobar una disminució magnificada en les reserves lipídiques dels animals tractats.

Combinació de l'oleoïl-estrona amb la rosiglitazona

La rosiglitazona, que pertany al grup de les tiazolidinadiones, és un potent fàrmac anti-diabètic que actua a través de la seva unió als receptors PPAR γ millorant la resistència a la insulina. No obstant això, l'activació d'aquests receptors comporta una estimulació de l'adipogènesi, fet que provoca que l'ús de la rosiglitazona sovint es trobi associat a un increment no desitjat de les reserves lipídiques; efecte secundari que limita la seva utilització

com antidiabètic en pacients ja obesos. En canvi, el tractament amb oleoïl-estrona proporciona una millora de la resistència a la insulina però amb uns efectes sobre les reserves lipídiques de l'organisme oposats als de la rosiglitazona. Per aquest motiu es va decidir **estudiar, mitjançant la combinació dels dos agents, els mecanismes a través dels quals la rosiglitazona i l'oleoïl-estrona regulen el metabolisme** aconseguint un efecte similar millorant la resistència a la insulina però amb uns efectes globals profundament diferents sobre el metabolisme energètic; centrant-nos específicament en la seva acció sobre el teixit adipós blanc i analitzant canvis en l'expressió de diferents indicadors i reguladors del metabolisme energètic i lipídic.

III. MATERIALS I MÈTODES

1. ANIMALS I CONDICIONS D'ESTABULACIÓ

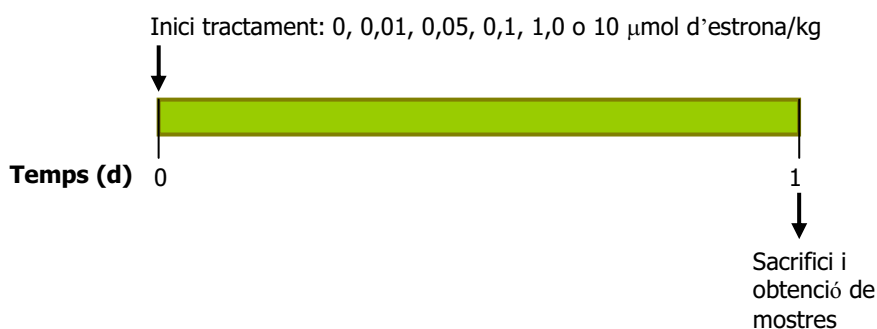
Els animals utilitzats en aquests treballs han estat en tots els casos rates mascle de la soca Wistar (Harlam-Interfauna Ibérica; Sant Feliu de Codines, Barcelona). Els animals s'han mantingut estabulats amb un cicle d'il·luminació de 12 hores (de 08:00 a 20:00) i unes condicions ambientals estàndard (temperatura de 20-22 °C, humitat relativa entre 70-80%). La dieta utilitzada per a la seva alimentació (exceptuant el períodes de dieta de cafeteria) ha estat un pinso de manteniment (A04, de Panlab; Barcelona) constituït per un 55% de glúcids, 14% de proteïna i 2,5% de greixos, amb un contingut energètic metabolitzable de 13,26 MJ/kg. Tots els animals tenien accés lliure tant al pinso com a l'aigua.

Tots els protocols que s'han dut a terme compleixen la normativa d'animals d'experimentació establerta per la UE, Espanya i Catalunya; i han obtingut l'aprovació del comitè ètic de manipulació d'animals d'experimentació de la Universitat de Barcelona.

2. DISSENY EXPERIMENTALS

2.1. ESTUDI DELS EFECTES DE L'ADMINISTRACIÓ ORAL D'ESTRONA SOBRE EL BALANÇ ENERGÈTIC

Aquest treball ha estat realitzat utilitzant un total de 36 rates mascle de la soca Wistar, amb un pes inicial entre 305-314 g, distribuïdes aleatòriament en 6 grups experimentals de 6 animals cadascun. Per tal d'estudiar els efectes de l'estrona sobre el balanç energètic dels animals s'ha preparat un ampli rang de dosis d'estrona, 0 (controls), 0,01, 0,05, 0,1, 1,0 i 10 μ mol d'estrona per kg de pes de l'animal i utilitzant com a vehicle l'oli de girasol. Cada grup rebia la dosi diària corresponent via intragàstrica al llarg d'un període de tractament de 10 dies.



Les dosis s'administraven a primera hora del matí i durant el període de tractament es controlava diàriament el pes i la ingesta dels animals.

2.1.1. PREPARACIÓ DE LES DOSIS D'ESTRONA

Per preparar les dosis d'estrone (Sigma; St. Louis, MO, USA) pel tractament dels animals s'han tingut en compte el pes dels animals, la puresa de la substància, la durada del tractament i la quantitat d'animals a tractar.

Per millorar la solubilitat de l'estrone en el vehicle d'administració (oli de girasol), s'afegia acetona a la solució, sent posteriorment evaporada. Tot i la millora de la solubilitat vam optar per preparar les dosis cada dos dies evitant el risc de precipitació de l'estrone i la no homogeneïtat de les dosis. Tot i així, abans de l'administració, escalfàvem les dosis i ens asseguràvem de la seva completa homogenització barrejant vigorosament.

Un cop preparades les solucions s'emmagatzemaven tapades amb parafilm a -20°C fins al dia del tractament. Era important assegurar-se que les dosis estiguessin temperades en el moment de l'administració intragàstrica.

2.1.2. SACRIFICI I OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Un cop finalitzat el tractament corresponent, els animals es sacrificaven per decapitació i es procedia a la recollida de mostres.

1. Es recollia la sang en un tub de plàstic de 50 ml intentat recuperar-ne el màxim aplicant un lleuger massatge sobre el cos de l'animal. El tub es mantenia en gel fins al moment del processat.
2. Les mostres de sang es centrifugaven a 4000 rpm durant 15 minuts per obtenir el sèrum, que es mantenia aliquotat a -20°C fins el dia de les valoracions.
3. Un cop extreta la sang, es buidava el contingut gastrointestinal dels animals i els cadàvers es congelaven en bosses de polietilè, prèviament pesades i segellades, per ser autoclavats posteriorment durant un període de 90 min a 120°C i 1 atm de pressió.
4. Després del procés d'autoclavat dels animals, aquests eren triturats amb una picadora de carn fins a obtenir un homogenat representatiu de tot l'animal, el qual era utilitzat per a la valoració de la composició corporal i que es conservava aliquotat a -20°C fins el dia de les valoracions.

2.2. ESTUDI DELS EFECTES DEL TRACTAMENT COMBINAT DE L'OE AMB EL TAMOXIFÈ

Aquest treball ha estat realitzat utilitzant un total de 30 rates mascle de la soca Wistar, amb un pes inicial entre 311-315 g, distribuïdes aleatòriament en 5 grups experimentals de 6 animals cadascun. Per tal d'estudiar si els efectes de l'OE sobre el balanç energètic són mediatos a través del receptor d'estrògens s'ha combinat l'administració d'OE amb el tamoxifè, un dels

antagonistes dels receptors d'estrògens més àmpliament utilitzats. Cada grup rebia la dosi diària corresponent via intragàstrica al llarg d'un període de tractament de 10 dies.

Les dosis s'administraven a primera hora del matí i durant el període de tractament es controlava diàriament el pes i la ingesta dels animals.

Grups experimentals i tractaments administrats

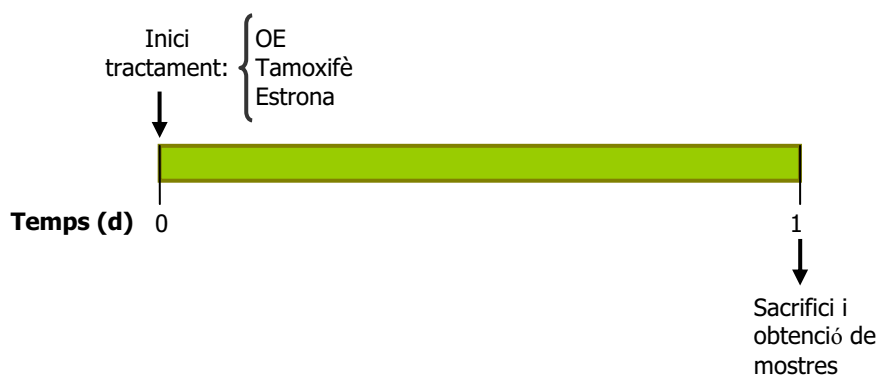
Grup control: 0,2 ml d'oli de girasol

Grup OE: 10 μ mols d'OE/kg

Grup tamoxifè: 1,35 μ mols de tamoxifè/kg

Grup OE + tamoxifè: 10 μ mols d'OE/kg + 1,35 μ mols de tamoxifè/kg

Grup estrona: 50 nmols d'estrona/kg



2.2.1. PREPARACIÓ DE LES DOSIS D'OE, TAMOXIFÈ I ESTRONA

Per preparar les dosis pel tractament dels animals s'han tingut presents el pes dels animals, la puresa de la substància, la durada del tractament i la quantitat d'animals a tractar.

Per a la correcta dissolució de l'OE (OED; Barcelona, Espanya) en el vehicle d'administració (oli de girasol) es feia una incubació de la barreja a 37°C o bé s'agitava suament amb una vareta magnètica a l'agitador.

Les dosis de tamoxifè (Sigma; St. Louis, MO, USA) es van preparar igual que les d'OE, ja que aquest presentava una bona solubilitat en l'oli de girasol. D'aquesta manera, els animals que rebien la combinació dels dos agents, ho feien de manera simultània en 0,2 ml d'oli.

Les dosis d'estrona (Sigma; St. Louis, MO, USA) es van preparar tal i com s'ha descrit en l'apartat 2.1.1.

Un cop preparades les solucions s'emmagatzemaven tapades amb parafilm a -20°C fins al dia del tractament. Era important assegurar-se que les dosis estiguessin temperades en el moment de l'administració intragàstrica.

2.2.2. SACRIFICI I OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Un cop finalitzat el tractament corresponent, els animals es sacrificaven per decapitació i es procedia a la recollida de mostres.

1. Es recollia la sang en un tub de plàstic de 50 ml intentat recuperar-ne el màxim aplicant un lleuger massatge sobre el cos de l'animal. El tub es mantenia en gel fins al moment del processat.
2. Les mostres de sang es centrifugaven a 4000 rpm durant 15 minuts per obtenir el sèrum, que es mantenia aliquotat a -20°C fins el dia de les valoracions.
3. Un cop extreta la sang, es buidava el contingut gastrointestinal dels animals i els cadàvers es congelaven en bosses de polietilè, prèviament pesades i segellades, per ser autoclavats posteriorment durant un període de 90 min a 120°C i 1 atm de pressió.
4. Després del procés d'autoclatat dels animals, aquests eren triturats amb una picadora de carn fins obtenir un homogenat representatiu de tot l'animal, el qual era utilitzat per la valoració de la composició corporal i que es conservava aliquotat a -20°C fins el dia de les valoracions.

2.3. ESTUDI DELS EFECTES DEL TRACTAMENT COMBINAT DE L'OE AMB ALTRES AGENTS APRIMADORS

Aquests treballs han estat realitzats utilitzant un total de 96 rates mascle de la soca Wistar, amb un pes inicial entre 190-220 g, distribuïdes aleatòriament en 16 grups experimentals de 6 animals cadascun. Per tal d'estudiar la modulació farmacològica dels efectes de l'OE sobre la ingesta i la composició corporal s'ha combinat l'OE amb diferents agents aprimadors. Cada grup rebia la dosi diària corresponent via intragàstrica (amb l'excepció del CL316,243) al llarg d'un període de tractament de 10 dies.

L'agonista dels receptors β_3 -adrenèrgics, el CL316,243, per la seva naturalesa química requeria d'una via administració subcutània, pel que es va optar per la implantació subcutània a nivell lumbar d'unes minibombes osmòtiques Alzet[®] (Charles River; Barcelona, Espanya) mitjançant un senzill procés quirúrgic.

La realització d'aquests experiments requeria d'un model animal amb sobrepès comparable al sobrepès dels humans. Aquest es va establir alimentant als animals *ad libitum* amb una dieta de cafeteria durant 5 setmanes prèviament al tractament, aconseguint una proporció inicial de greixos entre un 15 i 18%, comparable amb la que presenta un home adult amb sobrepès. Al final d'aquest període els animals presentaven un pes entre 330-390 g, el que representava un 26% més del pes que presentaven uns animals controls de la mateixa edat que havien estat alimentats amb un pinso estàndard.

Entre el període d'alimentació amb la dieta de cafeteria i l'inici dels tractaments, es va establir un període d'adaptació de 5 dies en el que els animals eren alimentats amb el pinso estàndard que posteriorment s'utilitzaria durant els 10 dies de tractament. Passat aquest temps el grup control alimentat amb dieta de cafeteria era sacrificat per obtenir els valors de referència a dia zero de tractament.

Les dosis s'administraven a primera hora del matí (amb l'excepció del CL316,243) i durant el període de tractament es controlava diàriament el pes i la ingesta dels animals.

Grups experimentals i tractaments administrats

Grup control alimentat amb pinso estàndard durant 5 setmanes

Grup control alimentat amb la dieta de cafeteria durant 5 setmanes (G0)

Grup control dels tractaments: 0,2 ml d'oli de girasol

Grup OE: 10 μ mols d'OE /kg

Grup sibutramina: 5 mg de sibutramina/kg

Grup OE + sibutramina: 10 μ mols d'OE/kg + 5 mg de sibutramina/kg

Grup dexfenfluramina: 3 mg de dexfenfluramina/kg

Grup OE + dexfenfluramina: 10 μ mols d'OE/kg + 3 mg de dexfenfluramina/kg

Grup fentermina: 5 mg de fentermina/kg

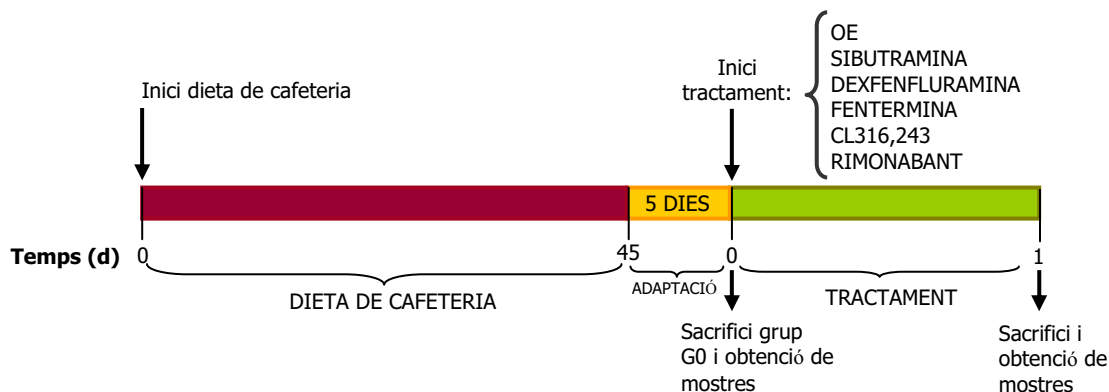
Grup OE + fentermina: 10 μ mols d'OE/kg + 5 mg de fentermina/kg

Grup CL316,243: 1 mg de CL316,243/kg

Grup OE + CL316,243: 10 μ mols d'OE /kg + 1 mg de CL316,243/kg

Grup rimonabant: 10 mg de rimonabant/kg

Grup OE + rimonabant: 10 μ mols d'OE /kg + 10 mg de rimonabant/kg



2.3.1. COMPOSICIÓ DE LA DIETA DE CAFETERIA

La composició diària de la dieta de cafeteria per a aconseguir uns animals amb sobrepès constava de:

- Bacon fumat (El Corte inglés). Mig tall a cada animal.
- Aproximadament 5 g de paté (La Piara tapa negra). Aquest era untat a sobre de les galetes.
- 2 galetes maria (Marbú).
- 50 ml per gàbia d'un preparat de llet en pols (Central Lechera Asturiana), sucre (200 g/l) i el complex mineral i vitamínic Gevral (10 g/l).
- Pinso de manteniment
- Aigua.

2.3.2. PREPARACIÓ DE LES DOSIS

Per preparar les dosis pel tractament dels animals s'han tingut presents el pes dels animals, la puresa de la substància, la durada del tractament i la quantitat d'animals a tractar.

Un cop preparades les solucions (amb l'excepció del CL316,243) s'emmagatzemaven tapades amb parafilm a -20°C fins al dia del tractament. Era important assegurar-se que les dosis estiguessin temperades en el moment de l'administració intragàstrica.

Dosis d'OE

Per a la correcta dissolució de l'OE (OED; Barcelona, Espanya) en el vehicle d'administració (oli de girasol) es feia una incubació de la barreja a 37°C o bé s'agitava suament amb una vareta magnètica a l'agitador.

Dosis de sibutramina, dexfenfluramina i fentermina

La insolubilitat dels tres fàrmacs, sibutramina (Pharma Chem Lansheng Corp; Shangai, China), dexfenfluramina (Pharma Chem Lansheng Corp; Shangai, China) i fentermina (Sigma; St. Louis, MO, USA) en oli de girasol va fer necessària la seva preparació utilitzant com a vehicle l'aigua i, per tant, l'administració d'una segona dosi independent en els animals que rebien la combinació de l'OE amb un d'aquests agents.

Dosis de rimonabant

El rimonabant (Pharma Chem Lansheng Corp; Shangai, China) va ser administrat als animals utilitzant com a vehicle l'oli de girasol. En proves prèvies aquest compost no presentava una

bona solubilitat ni en aigua ni en oli, optant finalment per aquest últim per tal d'administrar una dosi única en aquells animals que rebien la combinació de l'OE amb el rimonabant.

Utilitzant com a base l'oli (amb o sense OE), totes les dosis eren sonicades per tal d'aconseguir una emulsió homogènia en el moment de preparar-les i just abans de ser administrades als animals.

Dosis de CL316,243

La preparació de les dosis de CL316,243 (Sigma; St. Louis, MO, USA) requeria d'una activació prèvia de les minibombes osmòtiques. Aquestes eren incubades durant unes 3 hores en una solució salina a 37°C. Posteriorment, s'omplien amb la solució de CL316,343 i es procedia a la implantació en els animals.

Per a la implantació de les minibombes, els animals eren anestesiats via inhalatòria amb isofluorà. Es realitzava un petit tall a nivell lumbar separant suaument la pell amb les tisores i es col·locava la minibomba. La ferida era suturada, afegint una sulfanilamida (AZOL polvo, KERN Pharma S.L.,; Terrassa, Barcelona, Espanya) per tal de prevenir possibles infeccions.

Durant els 10 dies de tractament la minibomba alliberaria el CL₃₁₆₂₄₃ amb un flux de 0,5 µl/hora, equivalent a una dosi diària de 1 mg de CL_{316,243}/kg.

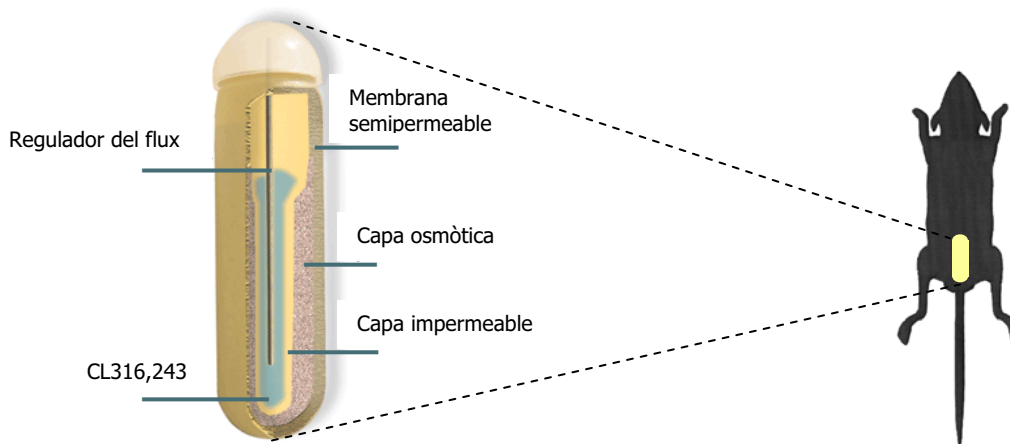


Figura 1. Secció transversal d'una minibomba osmòtica i lloc d'implantació en la rata.

2.3.3. SACRIFICI I OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Un cop finalitzat el tractament corresponent, els animals es sacrificaven per decapitació i es procedia a la recollida de mostres.

1. Es recollia la sang en un tub de plàstic de 50 ml intentat recuperar-ne el màxim aplicant un lleuger massatge sobre el cos de l'animal. El tub es mantenia en gel fins al moment del processat.
2. Les mostres de sang es centrifugaven a 4000 rpm durant 15 minuts per obtenir el sèrum i el plasma, que es mantenia aliquidat a -20°C fins el dia de les valoracions.
3. Un cop extreta la sang, es buidava el contingut gastrointestinal dels animals i els cadàvers es congelaven en bosses de polietilè, prèviament pesades i segellades, per ser autoclavats posteriorment durant un període de 90 min a 120°C i 1 atm de pressió.
4. Després del procés d'autoclat dels animals, aquests eren triturats amb una picadora de carn fins obtenir un homogenat representatiu de tot l'animal, el qual era utilitzat per la valoració de la composició corporal i que es conservava aliquidat a -20°C fins el dia de les valoracions.

2.4. ESTUDI DELS EFECTES DEL TRACTAMENT COMBINAT DE L'OE AMB LA ROSIGLITAZONA

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat 24 rates mascle de la soca Wistar, amb un pes inicial entre 190-220 g, distribuïdes aleatòriament en 4 grups experimentals de 6 animals cadascun. Amb l'objectiu d'estudiar els mecanismes a través dels quals la rosiglitazona i l'oleoil-estrona regulen el metabolisme aconseguint un efecte similar sobre la resistència a la insulina s'han administrat els dos agents sols i en combinació; i s'han analitzat els seus efectes tant a nivell d'ingesta i composició corporal, com a nivell de canvis en l'expressió gènica dels diferents indicadors i reguladors del metabolisme energètic en les diferents localitzacions adiposes. En aquest treball s'ha seguit el model experimental anteriorment descrit en els que els animals a tractar eren prèviament alimentats amb una dieta de cafeteria. Cada grup rebia la dosi diària corresponent via intragàstrica al llarg d'un període de tractament de 10 dies.

Les dosis s'administraven a primera hora del matí i durant el període de tractament es controlava diàriament el pes i la ingesta dels animals.

Grups experimentals i tractaments administrats

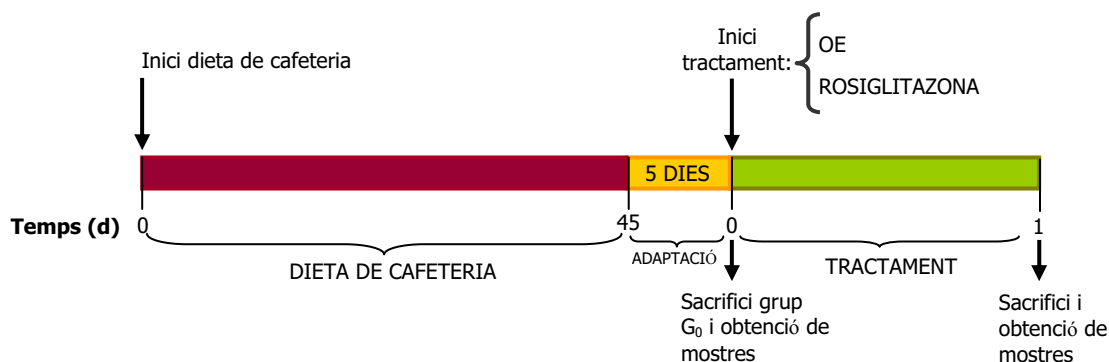
Grup control dels tractaments: 0,2 ml d'oli de girasol

Grup OE: 10 μmols d'OE /kg

Grup rosiglitazona: 5 mg de rosiglitazona/kg

Grup OE + rosiglitazona: 10 μmols d'OE/kg + 5 mg de rosiglitazona/kg

Per a l'obtenció dels valors de referència a dia zero de tractament s'ha utilitzat el grup control alimentat amb la dieta de cafeteria (G_0) de l'experiment anterior.



2.4.1. PREPARACIÓ DE LES DOSIS

Per preparar les dosis pel tractament dels animals s'han tingut presents el pes dels animals, la puresa de la substància, la durada del tractament i la quantitat d'animals a tractar.

Un cop preparades les solucions s'emmagatzemaven tapades amb parafilm a -20°C fins al dia del tractament. Era important assegurar-se que les dosis estiguessin temperades en el moment de l'administració intragàstrica.

Dosis d'OE

Per a la correcta dissolució de l'OE (OED; Barcelona, Espanya) en el vehicle d'administració (oli de girasol) es feia una incubació de la barreja a 37°C o bé s'agitava suament amb una vareta magnètica a l'agitador.

Dosis de rosiglitazona

La rosiglitazona (Pharma Chem Lansheng Corp; Shangai, China) va ser administrada als animals utilitzant com a vehicle l'oli de girasol. En proves prèvies aquest compost no presentava una bona solubilitat ni en aigua ni en oli, optant finalment per aquest últim per tal d'administrar una dosi única en aquells animals que rebien la combinació de l'OE amb la rosiglitazona.

Utilitzant com a base l'oli (amb o sense OE), totes les dosis eren sonicades per tal d'aconseguir una emulsió homogènia en el moment de preparar-les i just abans de ser administrades als animals.

2.4.2. SACRIFICI I OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Un cop finalitzat el tractament corresponent, els animals es sacrificaven per decapitació i es procedia a la recollida de mostres.

1. Es recollia la sang en un tub de plàstic de 50 ml intentat recuperar-ne el màxim aplicant un lleuger massatge sobre el cos de l'animal. El tub es mantenia en gel fins al moment del processat.
2. Les mostres de sang es centrifugaven a 4000 rpm durant 15 minuts per obtenir el sèrum i el plasma, que es mantenia aliquidat a -20°C fins el dia de les valoracions.
3. Seguidament es procedia a l'extracció dels teixits adiposos de les diferents localitzacions: retroperitoneal, epididimal, mesentèric i subcutani. Una mostra de cadascun era pesada i congelada ràpidament en nitrogen líquid i la resta del teixit es pesava per estimar el pes total del dipòsit adipós sencer. Aquestes restes de teixit eren incorporades a la carcassa de l'animal per l'obtenció de l'homogenat total.

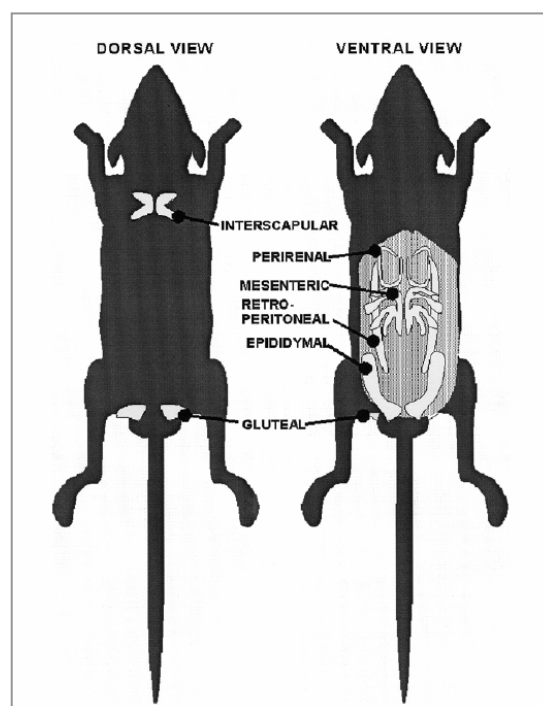


Figura 2. Esquema de la distribució dels diferents dipòsits més representatius de teixit adipós d'una rata adulta.

4. Totes les mostres de teixit s'emmagatzemaven a -80°C fins al moment de l'anàlisi.
5. Un cop extreta la sang i les mostres de teixit, es buidava el contingut gastrointestinal dels animals i els cadàvers es congelaven en bosses de polietilè, prèviament pesades i segellades, per ser autoclavats posteriorment durant un període de 90 min a 120°C i 1 atm de pressió.
6. Després del procés d'autoclatat dels animals, aquests eren triturats amb una picadora de carn fins obtenir un homogenat representatiu de tot l'animal, el qual era utilitzat per

la valoració de la composició corporal i que es conservava aliquotat a -20°C fins el dia de les valoracions.

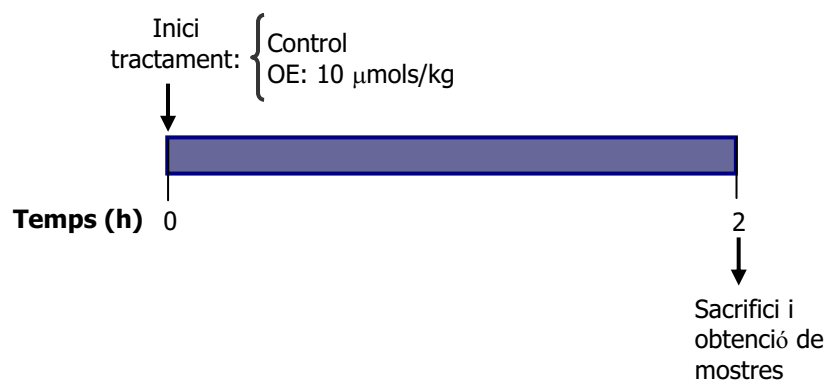
2.5. ESTUDI DELS EFECTES DEL TRACTAMENT D'OE SOBRE L'EXPRESSIÓ DELS PRINCIPALS PÈPTIDS MODULADORS DE LA INGESTA A CURT TERMINI

Aquest treball ha estat realitzat utilitzant un total de 14 rates mascle de la soca Wistar, distribuïdes aleatòriament en 2 grups experimentals de 7 animals cadascun. Per tal d'estudiar els efectes del tractament d'OE sobre l'expressió dels principals moduladors de la ingesta a curt termini, s'ha administrat una única dosi d'OE via intragàstrica als animals a l'inici de la fase de llum, sacrificant-los a les dues hores de l'administració.

Grups experimentals i tractaments administrats

Grup control: 0,2 ml d'oli de girasol

Grup OE: 10 μmols d'OE /kg



2.5.1. PREPARACIÓ DE LES DOSIS

Per preparar les dosis pel tractament dels animals s'han tingut presents el pes dels animals, la puresa de la substància i la quantitat d'animals a tractar.

Un cop preparades les solucions s'emmagatzemaven tapades amb parafilm a -20°C fins al dia del tractament. Era important assegurar-se que les dosis estiguessin temperades en el moment de l'administració intragàstrica.

Dosis d'OE

Per a la correcta dissolució de l'OE (OED; Barcelona, Espanya) en el vehicle d'administració (oli de girasol) es feia una incubació de la barreja a 37°C o bé s'agitava suament amb una vareta magnètica a l'agitador.

2.5.2. SACRIFICI I OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

A les dues hores de l'administració de l'OE els animals van ser sacrificats i ràpidament es va extreure i netejar el tracte gastrointestinal. El fundus de l'estómac, el duodè i la part proximal del jejú, i la part distal de l'íleon amb el colon eren disseccionats i seguidament congelats en nitrogen líquid.

Totes les mostres de teixit s'emmagatzemaven a -80°C fins al moment de l'anàlisi.

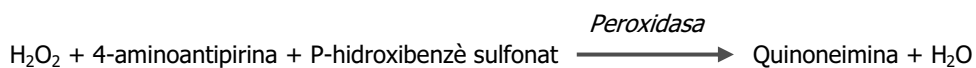
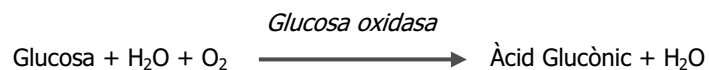
3. VALORACIONS SÈRIQUES

3.1. METABÒLITS PLASMÀTICS

3.1.1. GLUCOSA

La valoració de glucosa plasmàtica s'ha dut a terme amb el reactiu de Glucosa Sigma Diagnostics (Trinder) (Sigma Diagnostics; St. Louis, MO USA) i amb el reactiu de Glucosa GOD-PAP (Ref A11A01668, ABX Pentra, Horiba ABX; Montpellier, França). Tots dos mètodes de valoració estan basats en el descrit per Trinder (1969), en el qual es proposava l'ús de la glucosa oxidasa i la peroxidasa acoblada a un acceptor d'oxigen cromogènic. En el cas dels reactius utilitzats es genera un producte de color amb absorbància màxima a una longitud d'ona de 505 nm, directament proporcional a la quantitat de glucosa present en la mostra.

El sistema de reaccions acoblades és:



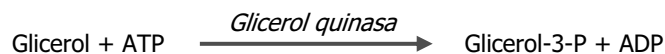
3.1.2. ÀCIDS GRASSOS LLIURES

Per a la determinació d'àcids grassos no esterificats en sèrum s'ha utilitzat el kit NEFA-C de Wako (Wako Chemicals GmbH; Neuss, Alemanya). Es tracta d'un mètode enzimàtic i colorimètric basat en l'acilació del coenzim A (CoA) pels àcids grassos en presència d'acil-CoA sintetasa (ACS). L'acil-CoA produït és oxidat per l'acil-CoA oxidasa (ACOD), generant-se peròxid d'hidrogen, que en presència de la peroxidasa permet la condensació oxidativa de la 3-metil-N-etil-N(β -hidroxietil)-antina (MEHA) amb la 4-aminoantipirina. El producte, de color porpra, s'ha mesurat colorimètricament a una longitud d'ona de 550 nm.



3.1.3. TRIACILGLICEROLS

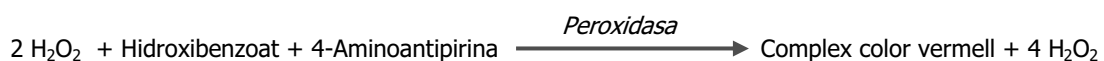
Els triacilglicerols en sèrum s'han valorat amb el kit Triglycerides (Cod 11528, BioSystems; Barcelona, Espanya) basat en les següents reaccions acoblades:



La lectura s'ha realitzat en un lector d'elisa a una longitud d'ona de 492 nm.

3.1.4. COLESTEROL TOTAL

El colesterol total en sèrum s'ha valorat amb el kit comercial Cholesterol Reagent Easy de Menarini (Kit B7576, Menarini; Firenze, Itàlia). El principi d'aquest mètode de valoració està basat en les següents reaccions enzimàtiques:



La lectura s'ha realitzat en un lector d'elisa a una longitud d'ona de 492 nm.

3.1.5 COLESTEROL HDL

El colesterol procedent d'HDL s'ha separat de la resta de colesterol del sèrum mitjançant el reactiu de precipitació RANDOX HDL Cholesterol (CH 204, Randox Laboratories LTD; Autrim, UK) que consisteix en precipitar les lipoproteïnes més grans deixant en suspensió les HDL. Un cop aïllades, la valoració del colesterol s'ha dut a terme paral·lelament amb la valoració del colesterol total amb el mateix kit comercial.

3.1.6. β -HIDROXIBUTIRAT

El β -hidroxibutirat en sèrum s'ha valorat amb el kit D-3-hydroxybutyric acid (0907979, Boehringer-Mannheim, Roche; Mannheim, Alemanya). El principi d'aquest mètode de valoració està basat en la oxidació del β -hidroxibutirat a acetoacetat catalitzada per la β -hidroxibutirat deshidrogenasa (3-HBDH) present a la pròpia mostra:



Durant aquesta reacció el NAD es redueix a NADH de manera equimolar, produint així un increment en l'absorbància a 490 nm proporcional a la concentració de β -hidroxibutirat present a la mostra.

3.1.7. PROTEÏNES

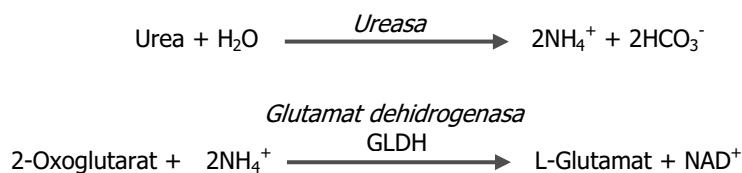
La determinació de proteïnes del sèrum s'ha realitzat mitjançant el mètode de Bradford. Aquest mètode està basat en la formació d'un compost d'adsorció de color blau entre els residus d'aminoàcids bàsics de les proteïnes i el colorant Blau de Coomassie. Per a la valoració s'ha utilitzat un kit comercial adaptat a microplaca de 96 pous (Prod: 1856209, Coomassie Protein Assay Reagent Kit, Pierce Biothecnology; Rockford, IL, USA).

La quantificació s'ha realitzat mitjançant la construcció d'una recta patró d'albumina bovina (BSA) (Prod: 23209, Pierce Biothecnology; Rockford, IL, USA). La lectura s'ha realitzat en un lector d'elisa a una longitud d'ona de 595 nm.

3.1.8. UREA

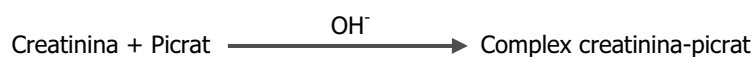
La determinació d'urea en sèrum s'ha realitzat utilitzant un kit enzimàtic de Menarini (Kit 30961, Menarini; Firenze, Itàlia). El mètode està basat en la hidròlisi de la urea present en la mostra en amoníac i diòxid de carboni per l'acció de la ureasa. La disminució de l'absorbància del NADH, a una longitud d'ona de 340 nm, és proporcional a la urea present a la mostra.

El sistema de reaccions acoblades és:



3.1.9. CREATININA

La determinació de creatinina en sèrum s'ha realitzat utilitzant un kit comercial de Menarini (Kit 30982, Menarini; Firenze, Itàlia) basat en el mètode de Jaffé. La creatinina produeix un complex taronja-vermellós en presència de picrat alcalí:

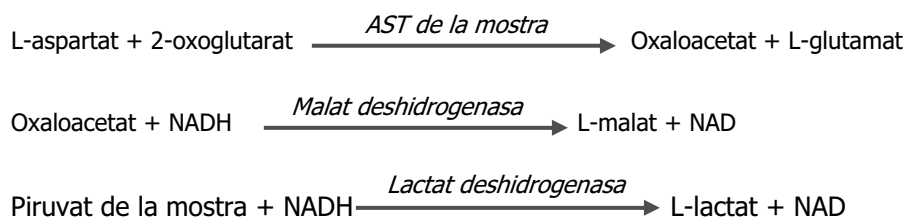


L'índex de variació de color es mesura a una longitud d'ona de 510 nm, i la diferència de l'absorbància a intervals fixes durant la conversió és proporcional a la concentració de creatinina en la mostra.

3.1.10. TRANSAMINASES

Aspartat aminotransferasa (AST)

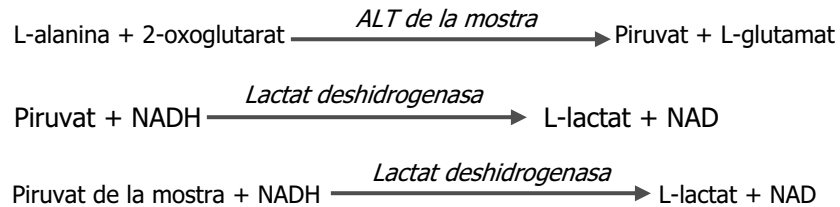
La determinació quantitativa de l'AST en sèrum s'ha realitzat utilitzant el kit comercial INFINITY™ AST REAGENT (51-25, Sigma Diagnostics; St. Louis, MO USA) basat en les recomanacions de la Federació Internacional de Química Clínica. Les reaccions implicades en el sistema són:



El reactiu porta incorporat l'enzim lactat deshidrogenasa per tal d'aconseguir una reducció ràpida i completa del piruvat endogen de manera que aquest no interfereixi amb l'anàlisi. La reacció es monitoritza mesurant la disminució de l'absorbància a 340 nm deguda a l'oxidació del NADH a NAD.

L-Alanina: 2-oxoglutarat aminotransferasa (ALT)

La determinació quantitativa de l'ALT en sèrum s'ha realitzat utilitzant el kit comercial INFINITY™ ALT REAGENT (52-25, Sigma Diagnostics; St. Louis, MO USA) basat en les recomanacions de la Federació Internacional de Química Clínica. Les reaccions implicades en el sistema són:



El piruvat endogen de la mostra es reduït ràpida i completament per l'enzim lactat deshidrogenasa durant el període inicial d'incubació de manera que no interfereixi amb l'anàlisi. La reacció es monitoritza mesurant la disminució de l'absorbància a 340 nm deguda a l'oxidació del NADH a NAD.

3.2. HORMONES

3.2.1. INSULINA

La concentració plasmàtica d'insulina s'ha determinat per radioimmunoassaig (RIA) mitjançant el kit comercial Rat Insulin RIA, Cat#RI-13K (Linco research, Inc.; St. Charles, MO, USA). Aquest mètode es basa en la competència que s'estableix entre la insulina no marcada de la mostra i una quantitat fixa d'insulina marcada amb ^{125}I per un nombre limitat de llocs d'unió a un anticòs anti-insulina, de manera que, quanta més insulina tingui la mostra, menys traçador podrà ser detectat.

La valoració d'insulina s'ha realitzat seguint les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir de 100 μl de mostra de sèrum. La sensibilitat del kit és de 0,1 ng/ml per a 100 μl de mostra. La reactivitat creuada és del 100% per a insulina de rata. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs s'ha utilitzat un comptador de radioactivitat gamma.

3.2.2. LEPTINA

La concentració plasmàtica de leptina s'ha determinat per RIA mitjançant el kit comercial Rat Leptin RIA, Cat#RL-83K (Linco research, Inc.; St. Charles, MO, USA). Aquest mètode es basa en la competència que s'estableix entre la leptina no marcada de la mostra i una quantitat fixa de leptina marcada amb ^{125}I per un nombre limitat de llocs d'unió a un anticòs anti-leptina, de manera que, quanta més leptina tingui la mostra, menys traçador podrà unir-se a l'anticòs.

La valoració de leptina s'ha realitzat segons les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir de 100 μl de sèrum. La sensibilitat del kit és de 0,5 ng/ml per a 100 μl

de mostra. La reactivitat creuada és del 100% per a leptina de rata. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs s'ha utilitzat un comptador de radioactivitat gamma.

3.2.3. ADIPONECTINA

La concentració plasmàtica d'adiponectina s'ha determinat per RIA mitjançant el kit comercial Mouse adiponectin RIA, Cat#MADP-60HK (Linco research, Inc.; St. Charles, MO, USA).

La valoració d'adiponectina s'ha realitzat seguint les instruccions del kit. Les mostres de sèrum s'ha diluït prèviament 1:1000 amb tampó d'assaig. La sensibilitat del kit és de 1ng/ml per a 100 µl de mostra. La reactivitat creuada és del 100% per a adiponectina de rata. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs s'ha utilitzat un comptador de radioactivitat gamma.

3.2.4. ESTRONA LLIURE

La concentració d'estrone lliure s'ha mesurat per RIA mitjançant el kit comercial Estrone RIA, DSL-8700 (Diagnostic Systems Laboratories, Inc.; Webster, Texas, USA). Aquest kit es basa en el principi bàsic d'un immunoassaig on competeixen la hormona marcada i no marcada per un nombre fix de llocs d'unió a un anticòs. La quantitat d'estrone marcada amb ^{125}I unida a l'anticòs és inversament proporcional a la concentració d'analit no marcat de la mostra. En aquest cas, la separació entre l'hormona unida i lliure es duu a terme amb un sistema de doble anticòs.

La valoració d'estrone lliure s'ha realitzat segons les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir de 50 µl de mostra de sèrum. La sensibilitat del kit és de 1,2 pg/ml per a 50 µl de mostra. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs s'ha utilitzat un comptador de radioactivitat gamma.

3.2.5. ESTRADIOL

La concentració d'estradiol s'ha determinat per RIA mitjançant el kit comercial Ultra-Sensitive Estradiol RIA, DSL-4800 (Diagnostic Systems Laboratories, Inc.; Webster, Texas, USA). Aquest kit es basa en el principi bàsic d'un immunoassaig on competeixen la hormona marcada i no marcada per un nombre fix de llocs d'unió a un anticòs. La quantitat d'estrone marcada amb ^{125}I unida a l'anticòs és inversament proporcional a la concentració d'analit no marcat de la mostra.

La valoració d'estradiol s'ha realitzat seguint les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir de 200 µl de mostra de sèrum. La sensibilitat del kit és de 2,2 pg/ml per a 200 µl de mostra. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs s'ha utilitzat un comptador de radioactivitat gamma.

3.2.6. OLEOÏL-ESTRONA

La majoria de l'estrone present en plasma es troba esterificada amb diferents àcids grassos, però el més abundant és l'àcid oleic. Per tant, valorant les formes esterificades d'estrone es pot assumir que estarem valorant essencialment oleat d'estrone. Per valorar els èsters d'estrone s'ha de realitzar prèviament el trencament de l'enllaç èster mitjançant un procés de saponificació, valorant posteriorment l'estrone lliure de la mostra. D'aquesta manera obtindrem un valor d'estrone total (lliure + esterificada) del que podrem calcular la part corresponent a la forma esterificada en restar els valors de la valoració d'estrone lliure plasmàtics.

Protocol de saponificació

1. Afegir 3 ml de cloroform:metanol (2:1) a 75 µl de plasma en un tub de vidre amb tap de rosca (tub Folch) de 10 ml i mantenir en agitació orbital durant 24 hores.
2. Afegir 1 ml de $MgCl_2$ 3,9 mM i deixar 15 minuts més en agitació orbital.
3. Centrifugar a 1.500 rpm a 10°C durant 15 minuts, descartar la fase superior 1 per aspiració i passar la fase inferior 1 a un altre tub Folch de 10 ml. Evaporar a sequedat a 55°C (bany sec) i amb corrent de nitrogen i deixar refredar.
4. Afegir 1 ml de KOH etanòlica (dissoldre 0,7 g KOH 85% en 2 ml d'aigua i afegir 25 ml d'etanol absolut) i tapar el tub Folch (no hermètic). Mantenir-lo 20 minuts a 85°C amb agitació ocasional.
5. Deixar refredar a temperatura ambient.
6. Afegir 2 ml d'acetat d'etil i 1 ml d'aigua destil·lada. Agitar amb el vòrtex durant 1 minut cada tub.
7. Centrifugar a 1.500 rpm a 10°C durant 10 minuts. Guardar la fase superior 2. A la fase inferior 2: afegir 2 ml d'acetat d'etil, agitar fort i centrifugar a 1.000 rpm a 10°C durant 10 minuts.
8. Descartar la fase inferior 3 i afegir la fase superior 3 a la fase superior 1 (guardada anteriorment).
9. Afegir a aquesta nova fase (2+3) unes gotes d'indicador de pH. Neutralitzar si és necessari amb una solució de KH_2PO_4 0,1 M.
10. Centrifugar a 1.500 rpm a 10°C durant 10 minuts. La fase inferior 3 es descarta i la fase superior 3 es passa a un tub de pyrex de 10 ml on s'evaporarà a sequedat a 55°C (en un bany sec) sota corrent de nitrogen.

L'extracte sec obtingut servirà per valorar l'estrone total mitjançant una adaptació del protocol del kit de RIA d'estrone.

Protocol de valoració d'estronea total

1. Resuspendre els extractes de les mostres obtinguts per saponificació del sèrum en 375 µl d'etanol. S'obté una dilució 1/5 de la mostra inicial.
2. Pipetejar 50 µl de l'extracte lipídic en un nou tub de pyrex i afegir-hi 950 µl de PBS (KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄·H₂O 8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM. Ajustar el pH a 7,4 i afegir un 0,1% d'albumina lliure d'àcids grassos). S'obté una dilució 1/20 de la mostra inicial.
3. Preparar una recta patró amb estronea en les mateixes condicions que es troben les mostres, és a dir, mantenint les mateixes proporcions d'etanol i també que s'han emprat per realitzar les dilucions dels extractes. A partir d'una solució mare d'estronea 1 µM en etanol, i conservant el 5% d'etanol en la dilució, preparar els següents punt de patró d'estronea: 0, 0,125 nM, 0,37 nM, 1,1 nM, 3,32 nM, 14,6 nM.
4. A partir d'aquí el protocol utilitzat ha estat el mateix que per valorar l'estronea lliure en plasma però partint de 50 µl de les dilucions de mostra/patró.

3.3. PÈPTIDS GASTROINTESTINALS

3.3.1. GHRELINA

La concentració plasmàtica de ghrelina s'ha determinat per RIA mitjançant el kit comercial Ghrelin (Rat, Mouse) RIA kit, Cat No: RK-031-31 (Phoenix Europe GmbH.; Karlsruhe, Alemanya), el qual determina la ghrelina total, incloent tant la forma Ser3-octanoïl ghrelina com la forma Ser3-des-octanoïl ghrelina.

La valoració de ghrelina s'ha realitzat seguint les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir de 100 µl de mostra de sèrum. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs s'ha utilitzat un comptador de radioactivitat gamma.

3.3.2. CCK

La concentració plasmàtica de CCK s'ha determinat per RIA mitjançant el kit comercial EURIA-CCK RIA kit, Cat No: RB 302 (Euro-Diagnostica; Malmö, Suècia), el qual presenta una elevada especificitat per les formes sulfatades de la CCK i una reactivitat creuada molt baixa amb la gastrina-17.

La valoració de CCK s'ha realitzat seguint les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir d'un extracte de la CCK provinent de 400 µl de plasma obtingut utilitzant l'heparina com a anticoagulant i l'aprotinina com a inhibidor de proteases. La sensibilitat del kit és de 0,3 pmol/l. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs s'ha utilitzat un comptador de radioactivitat gamma.

3.3.3. GLP-1

La concentració plasmàtica de GLP-1 s'ha determinat per RIA mitjançant el kit comercial GLP-1 (Total) RIA kit, Cat#GLP1T-36HK (Linco research, Inc.; St. Charles, MO, USA), el qual permet la determinació quantitativa de totes les formes.

La valoració de CCK s'ha realitzat seguint les instruccions del kit comercial utilitzant tubs de polipropilè i a partir d'un extracte del GLP-1 provinent de 300 µl de plasma obtingut utilitzant l'EDTA com a anticoagulant i l'aprotinina com a inhibidor de proteases. La sensibilitat del kit és de 3 pM. Per determinar l'hormona marcada unida a l'anticòs s'ha utilitzat un comptador de radioactivitat gamma.

4. VALORACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DE L'HOMOGENAT

4.1. LÍPIDS TOTALS

Per a la determinació dels lípids corporals totals s'ha realitzat una extracció dels lípids de les mostres de l'homogenat seguint la tècnica proposada per Folch l'any 1957. Aquesta tècnica es basa en la separació de les substàncies lipòfiles de les hidròfiles per efecte del coeficient de repartició entre dos dissolvents que són difícilment miscibles, com ara el triclorometà i una solució de metanol-salí (NaCl 0,9%).

Procediment

1. Pesar 0,5 g de mostra d'homogenat en tubs Folch de 15 ml als que s'afegeix 10 ml de cloroform:metanol (2:1).
2. Mantenir 24 hores en agitació orbital a temperatura ambient.
3. Filtrar el contingut dels tubs utilitzant un embut i cotó, transferint el filtrat a un nou tub Folch.
4. Afegir 2 ml de solució salina (NaCl 0,9%).
5. Mantenir en agitació orbital durant un mínim de 30 minuts.
6. Centrifugar els tubs a 1500 rpm durant 15 minuts per a facilitar la separació de les dues fases, orgànica i aquosa.
7. Extreure amb una pipeta Pasteur de vidre la fase inferior orgànica, que conté els lípids, i traspasar-la a uns motllos d'alumini prèviament tarats.
8. Deixar evaporar el dissolvent orgànic en una campana de gasos durant 3 hores i posteriorment durant 30 minuts en una estufa a 90°C fins obtenir un residu de color groguenc (oli) que equival al contingut lipídic de la mostra.

9. Tornar a pesar els motllos establint la diferència de pes que serà equivalent al pes dels lípids de la mostra.

$$\frac{\text{Pes final del motllo (g)} - \text{Pes inicial del motllo}}{\text{Pes de la mostra (g)}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = \text{g lípid/kg d'homogenat}$$

4.2. AIGUA TOTAL

Per tal de determinar el contingut hídric de l'homogenat s'ha establert la diferència de pes existent entre una mostra fresca i una mostra seca.

Procediment

1. Pesar la mostra fresca en uns motllos d'alumini prèviament tarats.
2. Assecar la mostra durant 24 hores en una estufa a 110°C per tal d'evaporar tot el contingut d'aigua.
3. Tornar a pesar la mostra, ja seca, establint la diferència de pes que serà equivalent al contingut hídric de la mostra.

$$\frac{\text{Pes mostra fresca} - \text{Pes mostra seca}}{\text{Pes mostra fresca}} \times 100 = \% \text{ d'aigua de la mostra}$$

4.3. PROTEÏNES

El contingut proteic de l'homogenat s'ha determinat pel mètode de Kjeldahl, el qual es basa en la conversió del nitrogen total present en la mostra a sals d'amoni que són posteriorment valorades per volumetria àcid-base.

El mètode de Kjeldahl consta de tres etapes:

- **Digestió:** conversió del nitrogen proteic en sulfat d'amoni.



- **Destil·lació:** separació per arrossegament amb vapor de l'amoniac i posterior solubilització en una solució àcida de concentració coneguda.



- **Valoració:** medició de la quantitat d'àcid neutralitzat per l'amoniac dissolt, el que indica la quantitat de nitrogen present en la mostra inicial. D'acord amb l'origen de la mostra, a través d'un factor es relaciona la quantitat de nitrogen trobat amb el percentatge de proteïna que el va originar.



Procediment

1. Pesar una mostra d'homogenat d'un pes aproximat entre 0,5 i 0,6 g i embolicar-la amb paper de filtre.
2. Introduir la mostra en un tub digestor de vidre.
3. Afegir una tableta catalitzadora (Cu 0,3/en $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
4. Afegir 15 ml d'àcid sulfúric (95-97%).
5. Introduir el tub digestor en el digestor (Tecator; Foss, Dinamarca) a una temperatura de 400°C.
6. Esperar aproximadament entre 1-2 hores fins que la mostra estigui totalment digerida i es doni el viratge de la mostra de color negre a groc pàlid (transparent).
7. Refredar la mostra a temperatura ambient.
8. Afegir 75 ml d'aigua destil·lada.
9. Introduir la mostra en la unitat Kjeltex i introduir 2 volums de NaOH al 40%.
10. Preparar un erlenmeyer amb un volum de 25 ml d'àcid bòric (4%) amb 2 o 3 gotes del colorant de Tashiro (vermell de metil 0,2% + blau de metilè 0,1% en etanol). Aquesta solució presenta un color lila que produeix un viratge a verd degut als vapors de sosa alliberats de la mostra.
11. Detenir la unitat Kjeltex quan el destil·lat arriba a un volum de 150 ml.
12. Finalment, per realitzar la valoració de la mostra cal neutralitzar amb el volum necessari de HCl 0,1M, el qual es determinat pel viratge del destil·lat de color verd a color lila.

Per determinar el % de proteïna de l'homogenat s'han aplicat les següents fórmules:

$$\% \text{ de Nitrogen} = \frac{14 \times N \times 0,1 \times 100}{m \times 1000} \qquad \% \text{ Proteïna} = \% \text{ de Nitrogen} \times 5,5$$

N és el volum de HCl i m el pes de la mostra

4.4. ENERGIA EMMAGATZEMADA

Per determinar l'energia emmagatzemada en els animals s'ha utilitzat una bomba calorimètrica (C-7000 Ika; Heitersheim, Alemanya). En 1881, Berthelot va dissenyar un contenidor tancat al que denominà bomba calorimètrica basant-se en el fet de que moltes substàncies, inclosos els hidrocarburs, reaccionen amb molta facilitat amb l'oxigen. L'objectiu era intentar mesurar el calor alliberat en les reaccions químiques.

La reacció bàsica de combustió que tenia lloc està basada en :



Les bombes calorimètriques utilitzades actualment es basen en el procés de combustió, a altes pressions, d'un substrat en una càmera d'acer mantenint un volum constant. La càmera d'acer està refrigerada per aigua i el calor generat en la combustió es absorbit a través d'aquesta. Així, a través de la mesura del canvi de temperatura de l'aigua podem determinar l'energia alliberada en el procés de combustió.

La bomba calorimètrica d'oxigen està constituïda bàsicament per tres parts:

- Una bomba (o obús), on s'emmagatzema la mostra. Aquesta s'omple d'oxigen per a la reacció de combustió.
- La càmera d'acer que conté l'aigua, el termòmetre i la bomba.
- La coberta exterior per aïllar l'aparell.

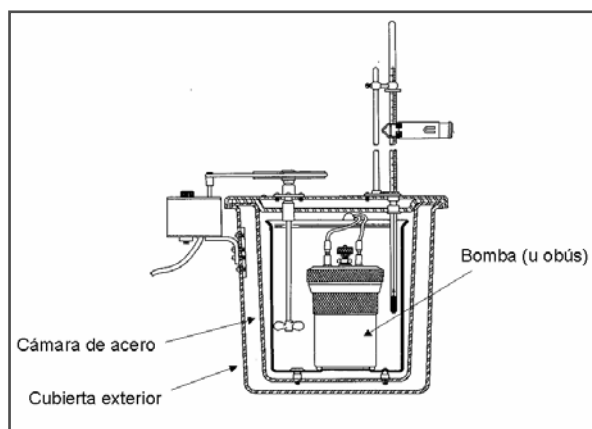


Figura 3. Secció transversal d'una bomba calorimètrica

Procediment

1. Calibrar la bomba calorimètrica mitjançant un patró d'àcid benzoic ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-COOH}$) en forma de pastilles, aproximadament 0,9-1 g.

2. Pesar la mostra (aproximadament 0,3-0,5 g) i col·locar-la en una càpsula de quars tal i com s'indica en la figura 4. A continuació, procedir al muntatge de l'obús, unint els fils d'ignició i comprovant que la mostra sempre quedi en contacte amb el fil per a que es pugui produir la reacció de combustió.



Figura 4. Esquema del muntatge de la bomba o obús

3. Introduir l'oxigen en la bomba. La pressió d'O₂ que es requereix per omplir la bomba és de 30 bar.
4. Introduir la bomba en el calorímetre i procedir a la combustió.
5. Deixar refredar la bomba en un sistema de refrigeració.

En finalitzar la combustió, el calorímetre registra el contingut energètic de la mostra en Joules per gram de mostra. Utilitzant la diferència entre l'energia estimada a dia zero i el contingut energètic mesurat a dia 10 s'ha pogut establir l'energia emmagatzemada en l'animal, i per diferència amb l'energia ingerida s'ha establert la despesa energètica.

5. DETERMINACIÓ DE LA CEL·LULARITAT I DE LA MASSA CEL·LULAR

5.1. VALORACIÓ DE L'ADN

El protocol utilitzat per a la valoració de l'ADN dels teixits adiposos estudiats està basat en el mètode fluorimètric descrit per Vytasek (Vytasek RA. *Anal Biochem*, 1; 120 (2): 243-8, 1982).

Reactius

- NaOH 1M
- NaOH 0.2M
- Na₂CO₃ 10 mM en NaOH 1M

- HClO₄ (PCA) 1M
- HCl 1M
- Àcid 3,5-diaminobenzoic (DABA) 20% (Sigma; St. Louis, MO USA)
- ADN de timus de vedella 1mg/ml (Sigma; St. Louis, MO USA)

Procediment

Homogeneïtzació:

1. Pesar 100 mg de teixit en un tub de vidre de 10ml i afegir 1ml de NaOH 1M. Guardar en gel.
2. Incubar al bany maria (100°C) durant 20 minuts amb agitació ocasional tapant els tubs amb una bala de vidre per tal d'evitar que s'evapori el mínim d'aigua possible.
3. Refredar ràpidament els tubs en gel.
4. Diluir l'homogenat amb 4 ml d'aigua destil·lada i barrejar vigorosament.
5. Centrifugar a 1.800 x g durant 15 minuts a 4°C.
6. Aliquotar l'homogenat evitant la capa superior del greix i congelar a -80°C fins al moment de la valoració.

Valoració:

1. Preparar el reactiu DABA: 1 volum DABA 20% per 3 volums de Na₂CO₃ 10mM en NaOH 1M. Guardar protegit de la llum durant 60-90 minuts.
2. Preparar la patró d'ADN de timus de vedella. A partir de la solució mare 1mg/ml es realitza una dilució prèvia 1/10 en NaOH 5mM, obtenint així una solució final de 100 µg/ml que servirà per preparar la recta patró de la valoració. Preparar els diferents punts de la patró en tubs eppendorf per duplicat.

| µg ADN/ml | ADN 100 µg/ml (µl) | NaOH 0.2M (µl) |
|------------------|---------------------------|-----------------------|
| 0 | 0 | 100 |
| 2,5 | 2,5 | 97,5 |
| 5 | 5 | 95 |
| 10 | 10 | 90 |
| 20 | 20 | 80 |
| 30 | 30 | 70 |
| 40 | 40 | 60 |
| 50 | 50 | 50 |
| 60 | 60 | 40 |

3. Incubar 100 µl de l'homogenat del teixit i estàndard d'ADN amb 100 µl de la solució de PCA 1M durant 20 minuts i en agitació a 70°C.
4. Refredar els tubs ràpidament en gel.
5. Afegir 200 µl del reactiu DABA preparat prèviament.
6. Incubar durant 1 hora a 37°C amb agitació.
7. Refredar els tubs ràpidament en gel.
8. Centrifugar els tubs a temperatura ambient durant 3 minuts a 14.000 x g.
9. Transferir 150 µl del sobrenedant a nous tubs de vidre i afegir 1,25 ml d'HCl 1M. Protegir els tubs de la llum fins al moment de la lectura.
10. Llegir la fluorescència a $\lambda_{exc}=410nm$ i $\lambda_{em}=520nm$ en cubetes de vidre, obtenint per extrapol·lació a la recta patró la concentració de l'ADN de la mostra en µg d'ADN/ml.

Càlcul de la cel·lularitat i massa cel·lular:

A partir del resultat obtingut de la valoració d'ADN, i basant-se en que una cèl·lula somàtica de rata té una quantitat fixa d'ADN de 5,6 pg/cèl·lula, es pot calcular el nombre de cèl·lules que formen el teixit adipós i la massa d'aquestes:

$$\frac{\mu\text{g ADN/ml} \times \text{Factor de dilució (5)}}{\text{Pes del fragment de teixit (0,1 g)}} = \mu\text{g ADN / g teixit}$$

$$\mu\text{g ADN / g teixit} \times \text{Pes total del teixit (g)} = \mu\text{g ADN del teixit}$$

$$\mu\text{g ADN del teixit} \times \frac{10^6 \text{ cèlula}}{5,6 \mu\text{g ADN}} = \text{cel·lularitat del teixit (nº cèl·lules)}$$

$$\frac{\text{Pes total del teixit (g)}}{\text{nº de cèlules}} \times \frac{10^9 \text{ ng}}{1 \text{ g}} = \text{Massa cel·lular (ng)}$$

6. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

6.1. EXTRACCIÓ DE L'ARN DELS TEIXITS

Per l'extracció de l'ARN s'ha utilitzat el kit Tripure[®] Isolation Reagent (Roche Applied Science; Indianapolis IN, USA), basat en una millora del mètode d'aïllament de l'ARN desenvolupat per Chomczynski i Sacchi (1987).

Reactius

- Reactiu Tripure[®] Isolation Reagent
- Cloroform
- Isopropanol
- Etanol 75%
- Aigua bidestil·lada estèril.

Procediment

Fase d'extracció de l'ARN del teixit:

La quantitat de teixit de partida per l'extracció de l'ARN varia en funció del tipus de teixit, utilitzant normalment un pes aproximat de 100 mg, amb l'excepció dels teixits adiposos pels que s'ha utilitzat un pes al voltant dels 400 mg a causa del seu baix rendiment en l'extracció.

En tots els casos s'ha seguit les indicacions del kit variant els volums dels reactius en funció del pes inicial de la mostra de teixit.

1. Pesar la quantitat de teixit a processar mantenint el teixit en tot moment congelat amb l'ajut de nitrogen líquid (esmicolar-lo amb l'ajut d'un morter). Transferir la mostra ràpidament a un tub de polipropilè de 10 ml estèril en el que prèviament haurem afegit 1 ml de Tripure[®] Isolation Reagent, 3 ml en el cas dels teixits adiposos. Mantenir els tubs sempre en en gel.
2. Homogeneïtzar la mostra amb el politró (Ultraturrax T25, Ika; Heitersheim, Alemanya) fins que no s'aprecii el teixit, aproximadament 3 cicles de 10 segons cadascun per evitar que la mostra es sobreescalfi i degradi. Netejar amb etanol i aigua la sonda del politró entre mostra i mostra per evitar contaminacions.
3. Transferir l'homogenat a un tub eppendorf, o repartit en dos en el cas dels teixits adiposos, i centrifugar a 12000 x g durant 10 minuts a 4°C.
4. Recollir el sobrenedat evitant la capa superior de greix (si n'hi ha) i passar a un nou eppendorf.

Fase de separació:

5. Incubar l'homogenat durant 5 minuts a temperatura ambient per assegurar la completa dissociació dels complexos nucleoproteics.
6. Afegir 0,2 ml de cloroform per cada ml de Tripure[®] Isolation Reagent utilitzat.
7. Tapar el tub i barrejar vigorosament durant 15 segons.

8. Incubar a temperatura ambient durant 10-15 minuts.
9. Centrifugar 12.000 x g durant 15 minuts a 4°C.

Després de la centrifugació obtindrem dues fases separades per una interfase blanca:

- Sobrenedant: Fase aquosa de color transparent formada per l'ARN. Representa un 60% del volum del Tripure® Isolation Reagent utilitzat a l'inici.
- Interfase i infranedant rosat contenen la proteïna i el DNA de la mostra.

Aïllament de l'ARN:

10. Transferir el sobrenedant transparent (ARN) a un nou eppendorf, tenint molta cura de no arrossegar la interfase blanca.
11. Precipitar l'ARN de la fase aquosa afegint 0,5 ml isopropanol.
12. Tapar el tub i barrejar per inversió diverses vegades.
13. Incubar la mostra de 5-10 minuts a temperatura ambient per afavorir la precipitació de l'ARN.
14. Centrifugar la mostra a 12.000 x g durant 10 minuts a 4°C.
15. Descartar el sobrenedant per decantació.
16. Afegir 600 µl d'etanol al 75% per cada ml de Tripure® Isolation Reagent inicial.
17. Agitar el pellet d'ARN, ja en etanol, per rentar-lo bé.
18. Centrifugar a 7500 x g durant 5 minuts a 4°C. Descartar el sobrenedant per decantació i eliminar el màxim d'etanol possible.
19. Deixar assecar les restes d'etanol a l'aire.
20. Resuspendre el pellet d'ARN en aigua bidestil·lada estèril. El volum dependrà del teixit de procedència de l'ARN i de la quantitat de partida, entre 15-25 µl pels teixits adiposos i entre 50 i 100 µl per la resta de teixits.
21. Per millorar la dissolució de l'ARN les mostres s'incuben durant 15 minuts a 58°C en un termomixer.
22. Quantificar la solució d'ARN amb l'espectrofotòmetre.
23. Per a la seva correcta conservació, les mostres d'ARN s'han de guardar a -80°C.

6.2. QUANTIFICACIÓ DE L'ARN

La quantificació d'ARN s'ha realitzat utilitzant un espectrofotòmetre nanodrop de precisió (ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc.; Wilmington DE, USA). Aquest permet detectar la

concentració d'ARN utilitzant únicament 1 µl de mostra. Els límits de detecció oscil·len entre 2 ng/µl i 3700 ng/µl.

Aquest protocol realitza una doble lectura, a una longitud d'ona de 260 nm on es dona la màxima absorció dels àcids nucleics i a una longitud d'ona de 280 nm on es dona la màxima absorció de les proteïnes. La relació 260/280 és un indicatiu tant de la puresa com de la integritat de les mostres d'ARN. Una relació entre 1,8 i 2 és indicativa d'una mostra pura d'ARN.

Un cop quantificades les mostres s'han igualat les concentracions de totes a 0,5 µg d'ARN/µl amb aigua bidestil·lada estèril.

6.3. COMPROVACIÓ DE LA INTEGRITAT DE L'ARN

Un cop quantificada la concentració d'ARN de les mostres s'ha comprovat el seu estat mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 0,8%.

S'ha carregat 1 µg d'ARN i s'ha deixat córrer el gel a 90 volts durant 45 minuts. La visualització amb un transil·luminador de llum ultraviolada ens permet comprovar la integritat dels ARNm ribosòmics 18s i 28s.

6.3.1. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

L'electroforesi en gel d'agarosa és un mètode estàndard per separar fragments d'àcids nucleics. La mobilitat dels fragments d'ARN és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. El factor més important en la separació és la mida del porus del gel, és a dir, la concentració d'agarosa. Rutinàriament s'ha utilitzat una concentració del 0,8% d'agarosa.

Solucions

- Solució de bromur d'etidi
- Agarosa Seakem
- TAE 10x
- Tampó de càrrega 5x: xilen cianol 0,025% i blau de bromofenol 0,025% en glicerol al 50%
- Marcador de pes molecular de 100 bp (Roche Applied Science; Indianapolis, IN USA)

Procediment

1. Pesar 0,4 g d'agarosa i afegir 50 ml de TAE 1x en un erlenmeyer de 150-200 ml.
2. Fondre l'agarosa en un microones i deixar refredar a temperatura ambient.
3. Preparar la cubeta d'electroforesi.

4. Quan l'erlenmeyer que conté la solució d'agarosa no cremi en contacte amb la pell, afegir el bromur d'etidi (2,5 µl de l'estoc a 10 mg/ml per un gel de 50 ml). Barrejar bé i abocar sobre la cubeta d'electroforesi.
5. Esperar que el gel solidifiqui, extreure la pinta i carregar les mostres.
6. Afegir tampó TAE 1x de manera que aquest cobreixi totalment el gel.

Preparació de les mostres

1. En un eppendorf de 1,5 ml, afegir 2 µl de la mostra d'ARN, 2 µl de tampó de càrrega 5x (concentració final 1x) i 6 µl d'aigua. Carregar un volum final de 10 µl. De forma paral·lela es prepara un tub amb el marcador de pes molecular.
2. Es carrega cada mostra en un pou del gel, es connecten els electrodes a la font d'electroforesi i es fa córrer el gel a un voltatge constatat de 60-80 V. Els àcid nucleics, amb càrrega negativa, migren cap al pol positiu.
3. El resultat de l'electroforesi es comprova en un transil·luminador de raigs UV connectat a un sistema d'obtenció d'imatges per obtenir les imatges digitals dels gels.

6.4. RT-PCR

L'estudi de l'expressió gènica mitjançant la tècnica de la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) en temps real, requereix d'un pas previ de retrotranscripció (RT), és a dir, una síntesi d'ADN complementari (ADNc) a partir de l'ARN de les mostres. Posteriorment també s'ha realitzat una preamplificació de l'ADNc resultant de la RT.

Reactius

- Oligo (dT)₁₅ (40µg/100µl) (Roche Applied Science; Indianapolis, IN USA)
- Mix de dNTP (10 nM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP a pH neutre) (GeneCraft GmbH; Lüdinghausen, Alemanya)
- Inhibidor de Ribonucleases (Rnasin Ribonuclease Inhibitor) 40 U/µl (Promega; Madison, WI USA)
- Transcriptasa reversa MMLV (200 U/µl) (Promega; Madison, WI USA)
- Tampó de reacció de la Transcriptasa Reversa MMLV 5X : 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ i 50 mM DTT (Promega; Madison, WI USA)
- Aigua autoclavada estèril

Procediment

1. Per tal de destruir estructures secundàries, es duu a terme un pas inicial en que s'incuben durant 5 minuts a 70°C una barreja formada per 2 µg d'RNA amb 40 µg d'oligo(dT) en un volum final de 10 µl que s'ajustarà amb aigua estèril.
2. Passats els 5 minuts es refreden els tubs ràpidament en gel.
3. Es prepara una barreja de 15 µl per reacció que contingui: 200 U MMLV RT, 25 U RNAsin, 0,5 mM dNTPs i tampó de MMLV RT 1X.
4. S'afegeixen els 15 µl de la barreja a cada tub i s'incuba la reacció a 42°C durant 60 minuts.
5. Es fa un pols de centrífuga per a recuperar tot el volum que hagi pogut quedar a les parets del tub i es guarda el producte de la reacció en alíquotes a -20°C. S'ha comprovat que aquest producte no es pot congelar i descongelar massa vegades, donat que en alguns casos pot ocasionar problemes en la reacció de PCR. Per tant és millor que es mantingui congelat fins el dia que es procedeixi a realitzar l'amplificació.

6.5. DISSENY D'ENCEBADORS

Per al disseny d'encebadors específics per a cada gen del que es vol analitzar la seva expressió s'ha realitzat:

1. Recerca de la seqüència de l'ARNm del gen d'interès a les bases de dades del *PubMed* i *Ensembl Genome Browser*. Aquesta última permet disposar de gran informació del gen d'interès.
2. Un cop seleccionada la seqüència, transferim aquesta, o un fragment, al programa *Primer 3* amb el que dissenyarem els encebadors. Per tal d'escollir els millors encebadors entre totes les opcions que el programa ofereix aplicarem els següents criteris:
 - És aconsellable que la longitud del fragment amplificat (amplicó), flanquejat pels dos encebadors, no superi els 150 parells de bases (pb).
 - La longitud dels encebadors oscil·li entre 18 i 22 pb.
 - La temperatura de fusió (*melting*) òptima és de 65°C, procurant mantenir un % GC entre el 40 i 60%.
3. Posteriorment, comprovar la possible formació de dímers i d'estructures secundàries en els encebadors seleccionats. Per a aquest procés s'han utilitzat els programes *Operon* i *Integrated DNA technologies* (IDTDNA).

4. Finalment per tal d'assegurar l'especificitat dels encebadors al gen del que es vol estudiar l'expressió, es realitza un *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (*Pubmed*). Aquesta base de dades busca regions de similitud entre la seqüència donada i les seqüències de les bases de dades obtenint així les regions amb més percentatge d'homologia.

A continuació es detallen les seqüències dels encebadors utilitzats per amplificar cadascun dels gens dels que s'ha quantificat l'expressió:

| GEN | | SEQÜÈNCIA ENCEBADORS (5'-3') | TAMANY AMPLICÓ (pb) | GENBANK GI |
|----------------|----------|--|---------------------|------------|
| ACC α | F: R: | AGGAAGATGGTGTCCGCTCTG GGGGAGATGTGCTGGGTCAT | 145 | 11559961 |
| ADIPONECTINA | F: R: | GGAGACGCAGGTGTTCTTGG AGCCCTACGCTGAATGCTGA | 152 | 62990185 |
| ADIPONUTRINA | F: R: | GTGTGCCCGAATGACCATGT GCCTTGGGGTTTGTGGAGAG | 112 | 144226244 |
| CCK | F: R: | CATCCAGCAGGTCCGCAAA TCCATCCAGCCCATGTAGTCC | 148 | 6978612 |
| C/EBP α | F: R: | GCTGAGCCGTGAACTGGACA CCAGCGACCCTAAACCATCC | 160 | 81295399 |
| C/EBP β | F: R: | CCAAGAAGGCGGTGGACAAG TGTGCTGCGTCTCCAGGTTG | 117 | 81295401 |
| CPT1b | F: R: | GTGCTGGAGGTGGCTTTGGT TGCTTGACGGATGTGGTTCC | 152 | 6978702 |
| FAS | F: R: | CTTGGGTGCCGATTACAACC GCCCTCCGTACACTCACTC | 163 | 8394157 |
| FABP4 | F: R: | CCTTTGTGGGACCTGGAAA TGACCGGATGACGACCAAGT | 152 | 16758093 |
| FATP1 | F: R: | GTGCGACAGATTGGCGAGTT TGCGTGAGGATACGCTGTT | 106 | 50054323 |
| GHRELINA | F: R: | CACCAGAAAGCCCAGCAGAGA CGAAGGGAGCATTGAACCTGA | 111 | 11067386 |
| GLUT4 | F: R: | CTTGATGACGGTGGCTCTGC CACAATGAACCAGGGGATGG | 127 | 6980957 |
| GLP-1 | F: R: | CTGGTGAAGGCCGAGGAAG AGCATGTCTGCGCCCAAGT | 75 | 6978881 |
| HSL | F: R: | CAAGCCCATAAGACCCATT CCGTAAGTCGCCCAGAATCC | 93 | 6981163 |

| GEN | | SEQÜÈNCIA ENCEBADORS (5'-3') | TAMANY AMPLICÓ (pb) | GENBANK GI |
|-------------------------|----------|--|---------------------|------------|
| IRS1 | F: R: | AATGAGGGCAGCTCCCCAAG GGTCCTGGTTGTGAATCGTGAA | 198 | 6981105 |
| LEPTINA | F: R: | CGGTTCTGTGGCTTTGGT CCGACTGCGTGTGTGAAATG | 130 | 6981147 |
| LPL | F: R: | GAAGGGGCTTGGAGATGTGG TGCCTTGCTGGGGTTTTCTT | 103 | 148747493 |
| PDE3b | F: R: | GCCAGGTGTGCATCAAATTAGC CCAGGGTTGCTTCTTCATCTCC | 123 | 8393928 |
| PERILIPINES | F: R: | GAGGGGCTGATCTGGCTTTG GCATCTTTTGCCGTCCTGAA | 102 | 6981371 |
| PPAR α | F: R: | TTCAATGCCCTCGAACTGGA GCACAATCCCCTCTGCAAC | 124 | 6981381 |
| PPAR β | F: R: | CCAGCCATAACGCACCCTTC TTCCACACCAGGCCCTTCTC | 73 | 6981383 |
| PPAR γ 1 | F: R: | CACTTTCTGACCGGACTGTGTG AAGTTGGTGGGCCAGAATGG | 144 | 148747595 |
| PPAR γ 2 | F: R: | TCGCTGATGCACTGCCTATGA CGAAGTTGGTGGGCCAGAAT | 81 | 6981385 |
| β ₁ AR | F: R: | TTCAACTGGCTGGGCTACGC CAAAGCAGGCCTGGAAA | 92 | 6978458 |
| β ₂ AR | F: R: | GGACAGACTACACAGGGGAGCA CCAGGGGCTTCTCACAAA | 82 | 55926226 |
| β ₃ AR | F: R: | CAGGCAGAACTCACCGCTCA TCCAGAAGTCAGGCTCCTTGC | 102 | 6978462 |
| RECEPTOR INSULINA | F: R: | TTGCTGAGGTGGGAGCCCTA GCCCGTCAAACCTGTGCAG | 84 | 8393620 |
| RESISTINA | F: R: | TCATGCCCAGAACCGAGTTG CAGCCCCAGGACAAGGAAGA | 109 | 21426804 |
| SREBP1c | F: R: | AAAACCAGCCTCCCCAGAGC CCAGTCCCATCCACGAAGA | 153 | 109490841 |
| TNF α | F: R: | GGTCCCTCTCATCAGTTCCA CGCTTGGTGGTTTGCTACGA | 104 | 82524821 |
| VISFATINA | F: R: | TCTGGAAATCCGCTCGACAC CACTCCGTCCCCTTGAATGA | 129 | 55741461 |
| ARBP | F: R: | CCCTTCTCCTTCGGGCTGAT TGAGGCAACAGTCGGGTAGC | 62 | 11693175 |

6.6. PCR A TEMPS REAL

Per l'estudi de les diferències en l'expressió gènica degudes als tractaments s'ha utilitzat la tècnica de la PCR en temps real.

La PCR en temps real és una tècnica semiquantitativa on el producte de PCR es analitzat a mesura que aquest es va formant, és a dir, aquest mètode combina els processos d'amplificació i detecció en un sol pas a diferència de la PCR semiquantitativa convencional. Així, la PCR en temps real és un mètode més sensible per a la quantificació del nombre de còpies d'una mostra o la comparació dels nivells d'expressió entre diferents mostres.

Concretament, per a realització d'aquest treball s'ha utilitzat la metodologia de *SYBR green* la qual es basa en la utilització de fluorocroms que augmenten notablement l'emissió de fluorescència quan s'uneixen a l'ADN de doble cadena. L'increment d'ADN en cada cicle es reflecteix en un augment proporcional de la fluorescència emesa. El principal inconvenient d'aquesta tècnica és la seva baixa especificitat, degut a que s'uneix de manera indiscriminada a productes generats inespecíficament o a dímers de primers, molt freqüents en la PCR. Amb la finalitat de detectar aquestes possibles amplificacions, es realitza una corba de *melting* en la que el producte amplificat es sotmès a un increment de temperatura per comprovar el punt de fusió, específic per a cada producte d'amplificació. En el cas que únicament s'obtingui un sol producte d'amplificació s'ha d'observar un sol pic que es correspon amb l'amplicó específic.

La reacció de PCR en temps real es caracteritza pel cicle en que l'amplificació d'una determinada quantitat de producte es detecta per primer cop, enlloc de per la quantitat de producte acumulat després d'un nombre determinat de cicles com succeeix en les PCR convencionals. Així, quantes més còpies del nostre producte tingui la mostra a l'inici de la reacció, menys cicles necessitarà per detectar un increment significatiu de la fluorescència monitoritzada. En la reacció de PCR en temps real es distingeixen 4 fases:

- Una primera fase que té lloc durant els primers cicles d'amplificació on es detecten pocs canvis de fluorescència definint-se una línia base.
- Una primera fase exponencial on la quantitat de fluorescència augmenta per sobre de la línia base indicant la detecció del producte amplificat. En aquesta fase, empíricament es fixa un llindar (threshold) de fluorescència per sobre de la línia base.
- A continuació trobem una fase logarítmica on la PCR arriba al període d'amplificació òptima.
- Finalment, trobem una fase estacionària que s'inicia per la limitació dels productes de reacció.

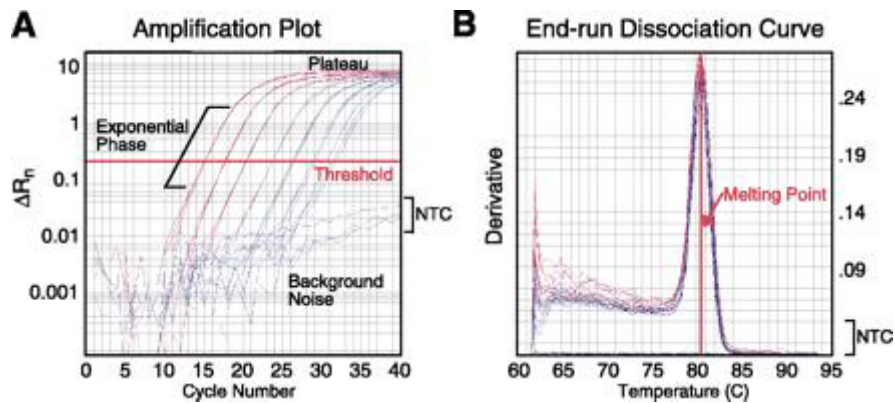


Figura 5. Exemple de resultats típics de PCR en temps real. A: Gràfic d'amplificació que mostra l'amplificació del senyal fluorescent (eix y) amb cada cicle de PCR (eix x). Es marca el Threshold fixat en la fase exponencial, el soroll de fons que es troba en la línia base i la fase estacionària (plateau) a la que arriba finalment la reacció. B: Corba de dissociació que només mostra un sol pic, el que indica que únicament hi ha un producte específic de PCR (Valasek i Repa, 2005).

Reactius i material

- Encebadors (Sigma-Genosys; Suffolk, UK)
- Power Syber Green PCR Mastermix (Applied Biosystems; Foster City, CA USA)
- Microplaca de PCR de 384 pous (Applied Biosystems; Foster City, CA USA)
- Optical adhesive covers (Applied Biosystems; Foster City, CA USA)
- Aigua bidestil·lada estèril
- Termociclador 7900 HT (Applied Biosystems; Foster City CA, USA)

Procediment

1. Preparar dilucions 1/40 de les mostres del producte d'ADNc obtingut en la reacció de RT-PCR.
2. Realitzar paral·lelament a partir d'una mostra representativa de cada grup dilucions seriadades per tal d'estimar-ne l'eficiència.
3. Pipetejar els components de cadascuna de les reaccions a la placa tenint en compte d'afegir un control negatiu de cadascun dels gens per comprovar l'absència de contaminacions dels reactius:
 - 8 ng de ADNc (4 μl de la dilució 1/40)
 - 300 nM de cada encebador (forward i reverse)
 - 1X Power Syber Green PCR Mastermix

La reacció té lloc en un volum final de 10 μl.

4. Col·locar l'adhesiu per tapar els pous de la placa i col·locar al termociclador.
5. Programar el termociclador amb el següent programa d'amplificació: desnaturalització inicial de 10 minuts a 95°C, 40 cicles d'amplificació de 15 segons de desnaturalització a 95°C i 1 minut d'anellament i extensió a 60°C. Al finalitzar la reacció d'amplificació es realitza una corba de melting.

Comprovació dels productes

Per comprovar que els productes de l'amplificació són correctes i que l'amplicó té la mida esperada, es realitza una electroforesi en gel d'agarosa al 2%. El producte de PCR es manté a 4°C fins al moment de la comprovació.

Resultats

El resultat és un paràmetre anomenat C_T (cicle llindar o threshold cycle) representatiu de l'inici de l'amplificació i que és utilitzat per realitzar la quantificació. Així, quant més s'expressi un gen menor serà el valor de C_T .

Es necessari la utilització d'un gen control endogen com a element normalitzador. La relació entre el C_T del gen desitjat i el C_T del gen control ens proporcionarà un C_T normalitzat del gen diana. En aquests experiments el gen control utilitzat ha estat l'ARBP (Acidic Ribosomic Binding Protein).

Per tal de poder comparar els resultats obtinguts entre els diferents òrgans i entre els diferents gens analitzats, s'ha estimat el nombre de còpies de cada ARNm per cèl·lula o teixit seguint el mètode semiquantitatiu descrit per Romero i col·laboradors (Romero et al, en premsa). La utilització d'aquest mètode implica l'establiment d'un llindar de fluorescència o *threshold* manual a OD 0.5 per a tots els assajos.

7. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Les diferents anàlisis estadístiques realitzades han estat realitzades utilitzant els programes Statgraphics plus 2.1 (Manugistics; Rockville, MD, USA), Statgraphics plus 5.1 (Manugistics; Rockville, MD, USA) i Prism 4 (GraphPad; San Diego, CA, USA).

IV. RESULTATS

1. Effects of oral estrone on rat energy balance

Ferrer-Lorente R, García-Peláez B, Gómez-Ollés S, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M.

Steroids, 70: 667-672, 2005.

Effects of oral estrone on rat energy balance

Raquel Ferrer-Lorente^{*}, Beatriz García-Peláez, Susana Gómez-Ollés,
José-Antonio Fernández-López, Xavier Remesar, Marià Alemany

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Received 27 December 2004; received in revised form 18 March 2005; accepted 28 March 2005

Available online 10 May 2005

Abstract

Oral doses of estrone from 10 nmol/(kg day) to 10 μ mol/(kg day) were given to adult Wistar male rats for 10 days. Body composition, energy balance, total body estrone balance and plasma metabolites and hormones were measured at the end of the treatment. Body weight (as well as food intake, body energy, fat and water accrual) increased at doses in the 10–100 nmol/(kg day) range, but decreased at higher doses. Energy expenditure decreased with increasing doses of estrone. Plasma metabolite changes suggested the maintenance of energy homeostasis, and lipid parameters indicated that lipid mobilization increased with the increasing doses of estrone. Plasma estrone, acyl-estrone and estradiol levels decreased at low doses and increased at high doses of estrone. We conclude that: (a) repeated estrone gavages, even at very high doses, do not result in the accrual of estrone in the body; (b) low doses of estrone promote growth and high doses decrease body mass and fat accretion; (c) administration of estrone at low doses decreases its circulating levels and the levels of estradiol and acyl-estrone, a situation reverted at higher doses and (d) estrone administration induces a dose-dependent shift towards lower energy expenditure.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Estrone; Estrogen; Body weight; Acyl-estrone

1. Introduction

Estrone is a weak estrogen. The ability of estrone to bind estrogen receptors is lower than that of estradiol, which under physiological conditions, probably results in practically no estrogenic response as a consequence of both low estrone levels and a high constant of affinity [1].

Most body estrone is found in the form of oleoyl-estrone [2]. This ester is synthesized from estrone by adipose tissue and released into the bloodstream, its concentrations correlate with body fat mass [3,4]. Oleoyl-estrone has been postulated to be a lipostatic signal that regulates body fat mass, and its experimental administration results in the loss of fat without concurrent loss of body protein [5,6].

Estrone is also freely interconverted to estradiol by steroid 17 β -oxidoreductases [7–9], not only in the ovaries, but also in adipose tissue [10,11]. The 17 β -oxidoreductases are widespread enzymes also responsible for the interconversion

of androstenedione and testosterone [8]. Thus, increases in the availability of estrone are expected to enhance estradiol-dependent estrogenic activity [9]. The growth-inducing effects of estrone administration [12] seem to override its mild estrogenic effects. This contrasts with the weight decreasing activity of estradiol [13]. The i.v. administration of pharmacological doses of oleoyl-estrone results in high circulating levels of estrone [14], but causes only mild estrogenic effects [1]. Oral administration of the estrone ester, however, precludes these effects by maintaining relatively low plasma levels of both estrone and estradiol [1]. This is partly due to the retention of portal blood estrone by the liver [15].

The different metabolism of estrone esters following oral or i.v. administration, and the conflicting data on the actual “estrogenicity” or growth-promoting effects of estrone prompted us to analyze the metabolic effects of oral estrone over a wide range of doses. We thus determined whether the conflicting data are due to a biphasic effect of estrone, a consequence of its interconversion to other molecular species, or both. Male rats were used in order to avoid the possible

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 93 403 46 06; fax: +34 93 403 70 64.
E-mail address: malemany@ub.edu (R. Ferrer-Lorente).

interference in females of the estrogen rhythms induced by the oestrus cycle.

2. Experimental

Wistar male rats (Harlan-Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Spain) initially weighing 305–314 g were housed in shared cages (three rats in each) under a light cycle (on from 08:00 to 20:00) in a temperature-controlled environment (20–22 °C). Food (maintenance rat chow pellets, from Panlab, Barcelona, Spain) and water were provided in excess at all times. Food consumption was measured daily in all cages and used to compute the mean energy intake of the animals in each group based on the metabolizable energy content of the rat chow (13.26 MJ/kg).

All procedures involving the handling of animals were in accordance with the guidelines for the use of experimental animals established by the European Union, Spain and Catalonia, and had obtained the approval of the Animal Handling Ethics Committee of the University of Barcelona.

The rats were randomly divided in six groups of six rats each. All animals were given a daily gavage of 0.2 ml of sunflower oil for 10 days; these gavages contained 0 (controls), 0.01, 0.05, 0.1, 1.0 or 10 μmol estrone (Sigma, St. Louis, MO, USA) per kilogram of rat weight.

On day 10, at the beginning of the light cycle, the rats were killed by decapitation and blood was recovered in dry heparinized beakers. Plasma was separated and frozen for analysis. The body carcasses were cleaned of the stomach and intestinal contents, weighed and used for the analysis of body components, the remains were sealed in polyethylene bags, autoclaved and then homogenized to a fine paste with a blender [6]. Samples of this paste were used for the analysis of: (a) water content, through differential weighing before and after desiccation at 110 °C for 12 h; (b) protein, by means of N analysis using a NA-1500 Carlo-Erba (Milano, Italy) elemental analyzer, and the conversion of N to protein [16]; (c) total energy content, using a bomb calorimeter (C-7000 Ika, Heitersheim, Germany); (d) total lipid, by extraction with trichloromethane/methanol and direct weighing of the dried extracts [17] and (e) total estrone in the lipid extract. This was accomplished by saponification with hydroalcoholic KOH of the lipid extract, followed by the extraction of the estrone in the medium with ethyl acetate. This organic fraction contained both the free and esterified (now freed by saponification) estrone in the lipid extract, estrone was then measured by radioimmunoassay [18]. Rat chow was also analyzed, it contained a mean 0.56 nmol/kg of total estrone.

Energy expenditure was calculated as energy intake (energy correlate of the food ingested) minus the energy accrual calculated as the difference in the energy content of controls and experimental groups corrected by initial body weight.

Plasma was used to measure glucose (Trinder glucose, from Sigma, St. Louis, MO, USA), triacylglycerols (kit 11528 from Biosystems, Barcelona, Spain), non-esterified

fatty acids (NEFA) (kit NEFA-C from Wako, Richmond, VA, USA), 3-hydroxybutyrate (kit 0907979 from Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany), total cholesterol (kit B7576 from Menarini, Firenze, Italy), HDL-cholesterol (precipitating kit 543004 from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; and kit B7576 from Menarini), total protein [19], insulin (sensitive rat insulin RIA kit, from Linco, St. Louis, MO, USA), leptin (rat insulin RIA kit, from Linco), acyl-estrone [18], free-estrone (kit DSL10/8700 from Diagnostic Systems Laboratory, Webster, TX, USA) and estradiol (kit TKSE2 from Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

Significant differences between groups were established with one-way ANOVA programs and the post hoc Duncan test using the Statgraphics Plus v.2.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA) software.

3. Results

Treatment with oral estrone for 10 days led to dose-related biphasic changes in body weight (Fig. 1). Daily doses of estrone in the range of 10–100 nmol/kg increased body weight. Estrone gavages above 100 nmol/(kg day) progressively decreased body weight. The analysis of the main body components responsible for these changes is also given in Fig. 1, which shows the 10 days changes of body protein, water or lipid pools, expressed as the percentage of the size of that pool on day 0. The rats showed net protein accrual rates at doses of estrone of up to 1 μmol /(kg day). Water content followed a similar pattern with accrual rates similar to those recorded for protein. Lipid accrual rates were larger than those of protein and water. As for water and protein, the effect was biphasic, with maximal increases in the 50–100 nmol/kg daily dose range and net losses of lipid at the highest doses of estrone. Controls had a mean protein content of 197 ± 4 g/kg, water content was 615 ± 4 g/kg, lipid content was 118 ± 9 g/kg and the mean energy content of the carcasses was 10.0 ± 0.2 MJ/kg.

Fig. 2 shows the calculated energy balance of rats subjected to 10 days of daily gavages of free-estrone. The rats again showed a biphasic response to the dose of estrone, following the same pattern observed in body weight and lipids. The lower doses of estrone increased energy intake and energy accrual with no changes in energy expenditure. A dose of estrone as low as 100 nmol/(kg day), however, markedly decreased energy expenditure, which allowed for maximal energy accrual despite the lowered energy intake. The higher doses of estrone tested reduced energy intake progressively, which was closely followed by energy accrual, since energy expenditure did not decrease further in the daily dose range of 0.1–10 μmol /kg.

Table 1 presents the estrone balance in the six experimental groups. Estrone intake ranged over five orders of magnitude (including controls), but none of the groups showed an accrual of estrone remotely proportional to the

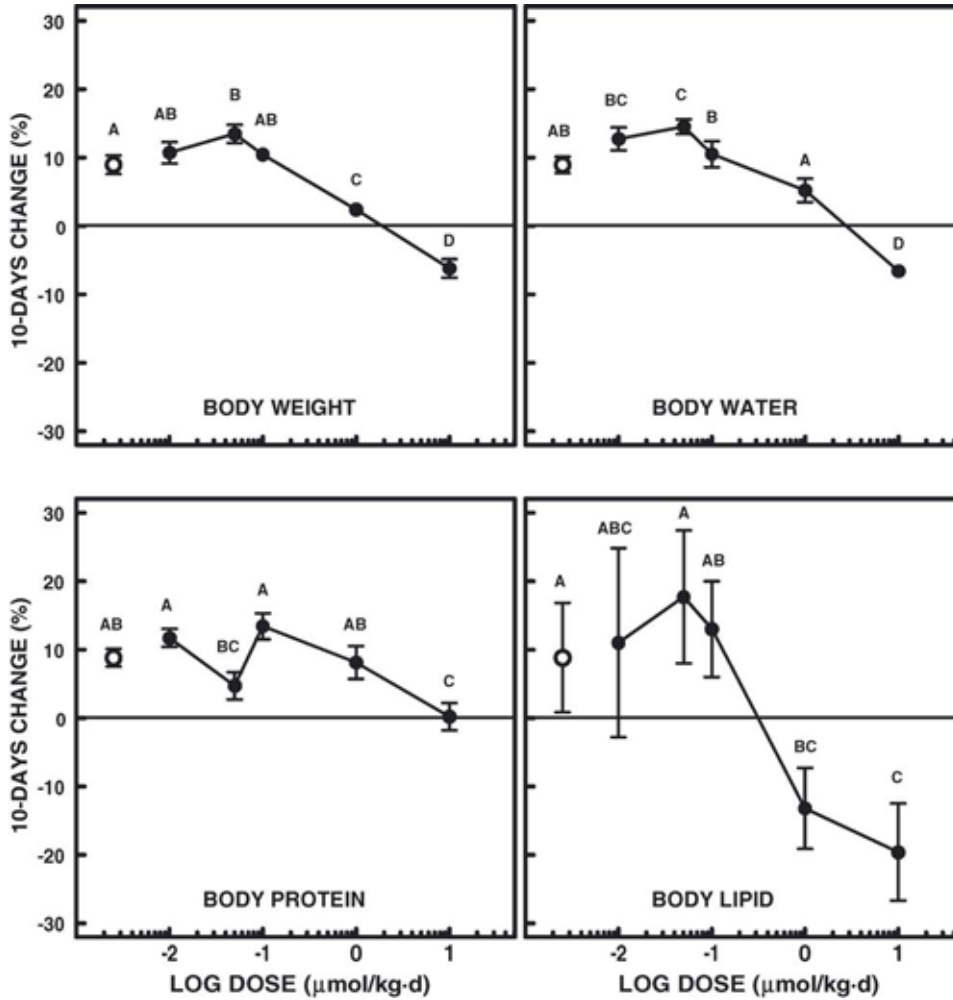


Fig. 1. Relationship between dose of estrone and changes in body weight and body composition of Wistar male rats after 10 days of daily gavages of 0–10 µmol/kg of free-estrone. Controls are represented by open figures, placed in the graph only for comparison (regardless of the actual dose of dietary estrone they received). Each point is the mean ± S.E.M. of six different animals. Statistical significance of the differences between groups was determined by ANOVA, the effect of dose on: weight $P=0.000$; protein $P=0.002$; water $P=0.000$; lipid $P=0.074$. Significantly different groups have different superscript letters ($P < 0.05$, post hoc Duncan test).

dose ingested. Total body estrone remained essentially unchanged. Free-estrone was only a fraction of total estrone, but this compartment increased with increasing doses of estrone from 0.5 to 1% to almost 8% of total estrone.

The plasma metabolites of rats treated with oral estrone for 10 days are shown in Table 2. Glucose levels were minimal in the daily dose range of 10–50 nmol/kg, but the changes induced by estrone treatment were negligible.

Table 1
Estrone pool and accrual in Wistar male rats receiving a daily gavage of 0–10 µmol/kg of free-estrone

| Parameter | 0 µmol/kg E ₁ | 0.01 µmol/kg E ₁ | 0.05 µmol/kg E ₁ | 0.1 µmol/kg E ₁ | 1 µmol/kg E ₁ | 10 µmol/kg E ₁ | P dose |
|---------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------|
| Estrone intake (nmol/day) | 0.012 | 3.05 | 15.2 | 30.4 | 304 | 3040 | – |
| Total estrone content (µmol/kg) | 1.34 ± 0.08 ^A | 1.16 ± 0.15 ^{AB} | 1.20 ± 0.15 ^{AB} | 0.90 ± 0.10 ^B | 0.954 ± 0.10 ^{AB} | 1.10 ± 0.08 ^{AB} | 0.075 |
| Free-estrone content (nmol/kg) | 16.3 ± 4.8 ^{AB} | 6.0 ± 0.8 ^B | 14.2 ± 2.3 ^{AB} | 53.3 ± 33.5 ^{AB} | 63.3 ± 32.5 ^{AC} | 87.3 ± 10.1 ^C | 0.016 |
| Total estrone content (nmol) | 424 ± 28 ^A | 344 ± 48 ^{AB} | 374 ± 59 ^{AB} | 296 ± 31 ^B | 285 ± 29 ^B | 296 ± 28 ^B | 0.052 |
| Estrone accrual (nmol/10day) | 37.2 ± 28.1 ^A | –23.4 ± 42.6 ^{ABC} | 16.4 ± 54.1 ^{AB} | –99.9 ± 34.0 ^C | –106.7 ± 32.2 ^C | –86.5 ± 25.0 ^C | 0.018 |

The data are the mean ± S.E.M. of six animals per group. The significance of the differences between groups was determined by ANOVA, and is shown in the P column. Significantly different groups in a row have different superscript letters (A–C) ($P < 0.05$, post hoc Duncan test).

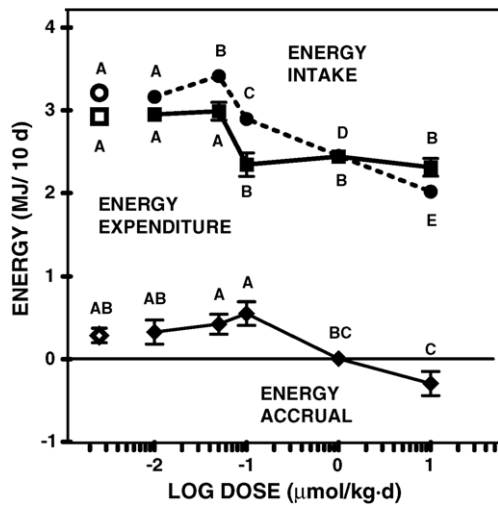


Fig. 2. Relationship between dose of estrone and changes in energy balance (per day) of Wistar male rats after 10 days of daily gavages of 0–10 $\mu\text{mol/kg}$ of free-estrone. Controls are represented by open figures, placed in the graph only for comparison (regardless of the actual dose of dietary estrone they received). Each point is the mean \pm S.E.M. of six different animals. Energy intake was calculated from the amount of food ingested, energy accrual data (estimated from differences in measured body energy content) and energy intake were used to calculate the estimated energy expenditure values. Statistical significance of the differences between groups was determined by ANOVA, the effect of dose on: energy intake $P=0.000$; energy accrual $P=0.000$; energy expenditure $P=0.000$. Significantly different groups have different superscript letters ($P < 0.05$, post hoc Duncan test).

Plasma triacylglycerols showed no changes. Non-esterified fatty acids decreased with low estrone doses and increased with increasing doses of estrone. 3-Hydroxybutyrate was higher in the controls than in most of the estrone-treated

groups like HDL-cholesterol values. Total cholesterol values decreased with increasing doses of estrone. Total plasma protein levels also increased with increasing doses of estrone. In any case, all plasma metabolite values observed were within the limits of normal, regardless of the dose of estrone given.

Table 3 presents the plasma hormone levels of rats treated with estrone for 10 days. Insulin levels peaked at the 50 nmol/kg dose and decreased thereafter to the minimal values found at the 10 $\mu\text{mol}/(\text{kg day})$ dose. Leptin levels showed a similar pattern, peaking at the daily dose range of 50–100 nmol/kg, and reaching minimal values at a dose of 10 $\mu\text{mol}/(\text{kg day})$.

Acyl-estrone levels decreased sharply with low dose estrone administration (10 nmol/(kg day)), increasing progressively, thereafter to values that did not differ from those of controls in the range of 10 $\mu\text{mol}/(\text{kg day})$. Free-estrone levels were very low and remained under the threshold for detection of the method used for most of the doses tested. However, higher doses of estrone markedly increased circulating levels of free-estrone. The same can be said for estradiol, which rose slightly with increasing doses of estrone.

The correlation between the levels of the hormones studied with the changes in body weight were analyzed by determining the statistical significance of the correlation values obtained when this parameter was paired with the plasma levels of hormones. The analysis also included the possible correlations between pairs of hormones. Table 4 shows the correlations found between the levels of circulating hormones and the net increase in body weight.

Leptin and insulin levels were directly correlated and also correlated with body weight gain. This correlation was reversed when applied to free- and acyl-estrone. Free- and

Table 2

Plasma metabolites in Wistar male rats receiving a daily gavage of 0–10 $\mu\text{mol/kg}$ of free-estrone

| Parameter | 0 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 0.01 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 0.05 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 0.1 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 1 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 10 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | P dose |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------|
| Glucose (mM) | 7.61 \pm 0.13 ^{ABC} | 7.05 \pm 0.08 ^{AB} | 7.00 \pm 0.20 ^B | 7.66 \pm 0.25 ^{AC} | 7.57 \pm 0.16 ^{ABC} | 8.01 \pm 0.33 ^C | 0.014 |
| Triacylglycerols (mM) | 1.62 \pm 0.14 ^A | 1.75 \pm 0.09 ^A | 1.76 \pm 0.09 ^A | 1.91 \pm 0.06 ^A | 1.89 \pm 0.04 ^A | 1.57 \pm 0.12 ^A | 0.247 |
| Non-esterified fatty acids (mM) | 0.63 \pm 0.06 ^A | 0.40 \pm 0.02 ^B | 0.35 \pm 0.03 ^B | 0.87 \pm 0.08 ^C | 0.93 \pm 0.08 ^C | 0.98 \pm 0.10 ^C | 0.000 |
| 3-Hydroxybutyrate (μM) | 536 \pm 88 ^A | 217 \pm 20 ^B | 256 \pm 19 ^B | 353 \pm 60 ^{AB} | 306 \pm 43 ^B | 410 \pm 88 ^{AB} | 0.014 |
| Total cholesterol (mM) | 1.82 \pm 0.09 ^A | 1.77 \pm 1.38 ^A | 1.81 \pm 0.07 ^A | 1.37 \pm 0.06 ^B | 1.15 \pm 0.05 ^{BC} | 0.96 \pm 0.02 ^C | 0.000 |
| HDL-cholesterol (mM) | 1.59 \pm 0.08 ^A | 1.46 \pm 0.09 ^A | 1.64 \pm 0.06 ^A | 1.23 \pm 0.06 ^B | 1.04 \pm 0.04 ^{BC} | 0.84 \pm 0.03 ^C | 0.000 |
| Protein (g/L) | 64.59 \pm 1.70 ^A | 63.03 \pm 0.50 ^A | 60.51 \pm 1.48 ^A | 80.28 \pm 2.59 ^B | 78.80 \pm 1.94 ^{BC} | 73.98 \pm 1.46 ^C | 0.000 |

The data are the mean \pm S.E.M. of six animals per group. The significance of the differences between groups was determined by ANOVA, and is shown in the P column. Significantly different groups in a row have different superscript letters (A–C) ($P < 0.05$, post-hoc Duncan test).

Table 3

Plasma hormones in Wistar male rats receiving a daily gavage of 0–10 $\mu\text{mol/kg}$ of free-estrone

| Parameter | 0 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 0.01 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 0.05 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 0.1 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 1 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | 10 $\mu\text{mol/kg E}_1$ | P dose |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------|
| Insulin (nM) | 0.45 \pm 0.06 ^{AB} | 0.61 \pm 0.05 ^B | 0.63 \pm 0.07 ^B | 0.41 \pm 0.05 ^A | 0.36 \pm 0.05 ^A | 0.17 \pm 0.01 ^C | 0.000 |
| Leptin (nM) | 0.45 \pm 0.05 ^A | 0.45 \pm 0.07 ^A | 0.65 \pm 0.11 ^B | 0.43 \pm 0.06 ^A | 0.32 \pm 0.04 ^{AC} | 0.18 \pm 0.02 ^C | 0.001 |
| Acyl-estrone (nM) | 269 \pm 62 ^A | 40 \pm 7 ^B | 34 \pm 10 ^B | 97 \pm 11 ^A | 124 \pm 7 ^A | 309 \pm 28 ^A | 0.000 |
| Free-estrone (nM) | 1.0 \pm 0.9 ^A | <0.3 ^A | <0.3 ^A | <0.3 ^A | 2.6 \pm 0.7 ^B | 7.7 \pm 0.4 ^C | 0.000 |
| Estradiol (pM) | <73 ^A | <73 ^A | <73 ^A | 121 \pm 18 ^A | <73 ^A | 213 \pm 35 ^B | 0.000 |

The data are the mean \pm S.E.M. of six animals per group. The significance of the differences between groups was determined by ANOVA, and is shown in the P column. Significantly different groups in a row have different superscript letters (A–C) ($P < 0.05$, post hoc Duncan test).

Table 4
Correlations between body weight gain and plasma hormones of Wistar male rats receiving a daily gavage of 0–10 $\mu\text{mol/kg}$ of free-estrone

| | Body weight gain | Estradiol | Estrone | Acyl-estrone | Leptin |
|--------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Insulin | $\oplus 0.000$ | $\ominus 0.007$ | $\ominus 0.006$ | $\ominus 0.001$ | $\oplus 0.000$ |
| Leptin | $\oplus 0.000$ | $\ominus 0.020$ | $\ominus 0.002$ | $\ominus 0.008$ | |
| Acyl-estrone | $\ominus 0.001$ | $\oplus 0.156$ | $\oplus 0.004$ | | |
| Estrone | $\ominus 0.000$ | $\oplus 0.012$ | | | |
| Estradiol | $\ominus 0.000$ | | | | |

Direct correlations are marked with \oplus and inverse correlations with \ominus ; numeric data are the *P* values for the correlations between the corresponding parameters.

acyl-estrone were inversely correlated with insulin and leptin. No direct correlations were found for estradiol, and the correlation between estrone and acyl-estrone was not statistically significant.

4. Discussion

Our data are consistent with a biphasic effect of estrone on body mass. In agreement with previous reports [6], daily doses of estrone in the 10–100 nmol/kg range markedly increased body weight due to increased water, protein and fat deposition. High doses of estrone, however, reduced body weight, affecting the water, protein and lipid content of the animals. The analysis of energy balance of these rats revealed that this effect of estrone was due to the combination of changes in energy intake (which closely followed the pattern described for body weight) and a sharp divide in energy expenditure, which was unaffected by low doses of estrone, but decreased from the 100 nmol/(kg day) dose onwards. High estrone levels lowered energy expenditure, a decrease that can be compared with that observed during pregnancy [20,21], since in this physiological state, decreased energy expenditure coexists with high estrone levels [22]. The energy expenditure-decreasing effect of estrone makes sense in a context of efficiency of the reproductive process, since it may enhance the growth effectiveness of the nutrients provided by the mother to her fetuses or sucklings.

The analysis of estrone gavage-derived changes in the hormonal environment suggests that these effects could not be due solely to estrone, since its plasma levels (and those of estradiol) actually decreased at the most effective growth-promoting doses of estrone. The administration of estrone, however, resulted in a biphasic effect on acyl-estrone levels. Since oleoyl-estrone promotes the shedding off of body fat [5,6], its decrease may promote the accumulation of energy at low estrone doses. At higher doses, however, acyl-estrone levels increased, reversing the trend and, thus, probably inducing body mass losses. The high reverse correlation between acyl-estrone levels and body weight gain (and insulin as the main energy accrual-inducing hormone)

suggests that oleoyl-estrone may be a key agent responsible for the changes in energy accrual in this experimental set-up.

The study of estrone balance suggests that the rats did not accrue estrone despite receiving enormous loads with respect to the size of their body pools, and there were no differences between dose-groups with respect to their estrone content per kilogram of body weight, except for small losses at the highest doses. The rapid elimination of estrone was comparable to that described for similar doses of oleoyl-estrone, which were also swiftly and effectively eliminated from the rat system [3].

Plasma metabolites showed a remarkable maintenance of energy homeostasis with varying doses of estrone, in spite of the high correlation between lipid metabolism indicators and increasing doses of estrone after a marked decrease between controls and the 10 nmol/(kg day) dose. Plasma proteins showed a definite increase in concentration with higher doses of estrone. Since at these doses, there was no net protein accrual (nor water loss), and the turnover of most plasma proteins was slow [23], we can tentatively conclude that there was a shift in water compartments (with no changes in overall water content) to the detriment of the plasma space, and an increase in the interstitial water space. The hemodynamic and oncotic consequences of this unexpected finding should be further explored, since the probable edema contrasts with the presumed higher oncotic pressure of plasma. This suggests that capillary water permeability may be affected by estrone treatment.

The biphasic effects of increasing doses of estrone on body metabolites and energy expenditure may be explained by their close correlation with acyl-estrone signalling, which in itself, is a biphasic correlate of estrone dosing. The uncertain effects of estrone gavages on body protein contrasts with its clear effects on body lipid, and further suggests that the observed effects of estrone gavage were essentially mediated by oleoyl-estrone, since the latter promotes lipid losses and protein preservation [5,6]. The rapid removal of estrone from the bloodstream, and the scant interconversion of estrone into estradiol may also help explain the limited estrogenic effects of estrone and the predominance of its growth enhancing effects.

The growth-promoting effects of oral estrone at relatively low doses mimic those observed using low doses of estrone esters, e.g. those found in milk, and indirectly suggest that the high estrone production during pregnancy and lactation may be a critical factor in the growth of the fetuses and sucklings.

Acknowledgements

This research was carried out with grants 01/1300 and 01/309 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias and AGL2000-0780 from the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias of the Government of Spain. Revision of the text by the SAL of the University of Barcelona is gladly acknowledged.

References

- [1] Cabot C, Grasa MM, Massanés RM, de Matteis R, Cinti S, Fernández-López JA, et al. Oleoyl-estrone does not have direct estrogenic effects on rats. *Life Sci* 2001;69:749–61.
- [2] Massanés RM, Grasa MM, López-Martí J, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X, et al. Zucker obese rats store less acyl-estrone than lean controls. *Int J Obes* 2003;27:428–32.
- [3] Fernández-Real JM, Sanchis D, Ricart W, Casamitjana R, Balada F, Remesar X, et al. Plasma oestrone-fatty acid ester levels are correlated with body fat mass in humans. *Clin Endocrinol* 1999;50:253–60.
- [4] Cabot C, Masanés R, Bullo M, García-Lorda P, Fernández-López JA, Salas-Salvadó J, et al. Plasma acyl-estrone levels are altered in obese women. *Endocr Res* 2000;26:465–76.
- [5] Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, et al. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes* 1966;20:588–94.
- [6] Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay MT, et al. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res* 2001;9:202–9.
- [7] Kautsky MP, Hagerman DD. 17-Estradiol dehydrogenase of ovine ovaries. *J Biol Chem* 1970;245:1878–84.
- [8] Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* 1997;18:281–305.
- [9] Peltoketo H, Nokelainen P, Piao YS, Vihko R, Vihko P. Two 17-hydroxysteroid dehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:431–9.
- [10] Bélanger C, Luu-The V, Dupont P, Tchernof A. Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res* 2002;34:737–45.
- [11] Meseguer A, Puche C, Cabero A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm Metab Res* 2002;34:736–41.
- [12] Remesar X, Tang V, Ferrer E, Torregrosa C, Virgili J, Masanés RM, et al. Estrone in food: a factor influencing the development of obesity? *Eur J Nutr* 1999;38:247–53.
- [13] Mattiasson I, Rendell M, Törnquist C, Jeppson S, Hulthén UL. Effects of estrogen replacement therapy on abdominal fat compartments as related to glucose and lipid metabolism in early postmenopausal women. *Horm Metab Res* 2002;34:583–8.
- [14] Sanchis D, Adán C, Ardévol A, Grasa MM, Cabot C, Balada F, et al. Short-term treatment with oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) strongly reduces the expression of the ob gene in young rats. *Biochem J* 1997;326:357–60.
- [15] Esteve M, Savall P, Blay MT, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Intestinal handling of an oral oleoyl-estrone gavage by the rat. *Life Sci* 2001;69:763–77.
- [16] Rafecas I, Esteve M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Whole-rat protein-content estimation—applicability of the Nx6.25 factor. *Br J Nutr* 1994;72:199–209.
- [17] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;232:497–509.
- [18] García-Peláez B, Ferrer-Lorente R, Gómez-Ollés S, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Measurement of total estrone content in foods. Application to dairy products. *J Dairy Sci* 2004;87:2331–6.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [20] Prentice AM, Scott W, Murgatroyd PR, Goldberg GR, Davies HL. Energy-sparing adaptations in human-pregnancy assessed by whole-body calorimetry. *Br J Nutr* 1989;62:5–22.
- [21] Luz J, Griggio MA. Energy-balance of pregnant rats. *Braz J Med Biol Res* 1990;23:729–33.
- [22] Berg FD, Kuss E. Serum concentration and urinary excretion of ‘classical’ estrogens, catecholestrogens and 2-methoxyestrogens in normal human pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 1992;251:17–27.
- [23] Sterling K. The turnover rate of serum albumin in man as measured by iodine 131-tagged albumin. *J Clin Invest* 1951;30:1228–37.

*2. Tamoxifen does not prevent the mobilization of body lipids elicited by
oleoyl-estrone*

Ferrer-Lorente R, García-Peláez B, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. *Steroids*, 69: 661-665, 2004.

Tamoxifen does not prevent the mobilization of body lipids elicited by oleoyl-estrone

Raquel Ferrer-Lorente, Beatriz García-Peláez, José Antonio Fernández-López, Xavier Remesar, Marià Alemany*

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Biology, University of Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Received 23 March 2004; received in revised form 1 June 2004; accepted 6 June 2004

Available online 11 September 2004

Abstract

Oleoyl-estrone is a powerful, slimming adipose tissue-derived signal that has biological effects widely opposed to those of its estrone moiety. The present experiment was designed to determine whether oleoyl-estrone effects on body energy are mediated by the estrogen receptor, blocked with the antagonist tamoxifen. Male Wistar rats were given daily oral doses of 10 $\mu\text{mol/kg d}$ of oleoyl-estrone in oil containing 0 or 0.40 mg/kg d of tamoxifen. The data were compared with controls receiving only oil or 50 nmol/kg d of free estrone. After 10 days, the rats were killed, and their body composition and plasma metabolites and hormones were analyzed. Rats receiving estrone increased their body energy and lipid content compared with controls. Both groups of oleoyl-estrone-treated rats lost body weight, energy, and lipid; the losses in the rats receiving tamoxifen alone were less marked than in those receiving oleoyl-estrone. No significant changes in plasma glucose or triacylglycerols were observed. The patterns of change of estrone sulphate, estradiol, and oleoyl-estrone were consistent with a noticeable hydrolysis of oleoyl-estrone. The lack of differences in the fat mass in oleoyl-estrone-treated rats irrespective of the presence of tamoxifen suggested that the estrogenic pathway was not responsible for the slimming effects observed. Thus, it can be concluded that oleoyl-estrone effects are not mediated through its conversion to estrone or estradiol acting through the estrogen receptor. Tamoxifen partly mimicked the slimming effects of oleoyl-estrone; this could be speculatively explained by tamoxifen acting through the oleoyl-estrone signalling pathway. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Oleoyl-estrone; Tamoxifen; Estrone; Estrogen; Body weight

1. Introduction

Oleoyl-estrone is a powerful hormonal signal synthesized in adipose tissue [1] that induces the loss of body lipid [2] by unbalancing energy intake and energy expenditure [3]. Oral oleoyl-estrone treatment results in decreases in body weight in humans [4] and rats, essentially at the expense of lipid with little or no effect on body protein [2,5].

In the intestine, part of oleoyl-estrone is hydrolyzed, yielding free estrone, but most of the ester is absorbed intact and incorporated into lipoproteins [6]. Most of the free estrone formed is retained by the liver and excreted as hydrophilic

esters [6]. The i.v. administration of oleoyl-estrone eventually results in hydrolysis of the ester by most tissues and considerably increases the circulating levels of estrone [7]. Oral administration of oleoyl-estrone, however, results only in limited increases of plasma estrone and estradiol, with negligible estrogenic effects even at doses inducing marked reductions in body lipid [8].

Estradiol (estrogen) induces a transient, relative loss of body weight [9], partly due to decreased food intake [10,11], effects on adipocyte proliferation [12,13], and energy supply via lipoprotein-lipase [14,15] and other systems. Estrone, on the other hand, at low pharmacological dosages induces increases in body weight [1] through increased food intake, higher fat deposition, and decreased energy expenditure; higher doses, however, reverse these effects and show a

* Corresponding author. Tel.: +34 93 403 46 06; fax: +34 93 403 70 64.
E-mail address: malemany@ub.edu (M. Alemany).

panorama of effects more akin to those of estradiol (unpublished results).

Tamoxifen is one of the most widely used estrogen receptor antagonists [16,17], but it has also agonistic estrogenic effects [18]. With regard to body lipid, tamoxifen induces hepatic steatosis in humans [19,20], but it has been found to deplete body lipids in rats [18].

Oleoyl-estrone is insoluble in water and is carried in the blood linked to lipoproteins [21]; its microprecipitation-suspension in aqueous systems does not result in appreciable binding to the estrogen receptor in contrast to estradiol and estrone [8]. The mechanism of action of oleoyl-estrone is unknown so far at the receptor level; the marked and specific effects on body fat and the absence of estrogenic effects [5,8], together with the highly specific configuration of the molecule inducing its biological action [22] suggest the existence of specific oleoyl-estrone receptors. However, the possibility that oleoyl-estrone is simply a highly lipophilic “carrier” of estrogen could not be ruled out; in that case, oleoyl-estrone hydrolysis would be a key element in the signalling pathway, releasing estrone, which then would act upon the estrogen receptor or be reduced to estradiol. The direct testing of oleoyl-estrone on rats in the presence of tamoxifen, a known antagonist of the estrogen receptor, can definitively clarify this point. For that reason, we studied the combined effects of oleoyl-estrone and tamoxifen. We used male rats to discount most of the endogenous estrogen activity and the cyclic changes experienced by females.

2. Experimental

Wistar male rats initially weighing 311–315 g from Harlan-Interfauna (Sant Feliu de Codines, Spain) were used. The rats were housed in collective cages (three in each) in a light cycle, and a temperature- and humidity-controlled environment. All animal handling procedures were approved by the Ethics and Animal Care Committee of the University of Barcelona, following the EU-, Spanish-, and Catalan Government-established norms and procedures. The rats were fed a standard pellet diet (“maintenance” type, from Panlab, Barcelona Spain) with an energy content of 13.26 kJ/g. Food consumption per cage, and rat weights were estimated daily.

Five groups of six rats each were randomly distributed. During 10 days, each rat received a daily gavage of 0.2 ml of sunflower oil containing: (a) controls [C]: nothing else; (b) tamoxifen [T]: a dose of 0.40 mg/kg tamoxifen (1.35 μ mol/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA); (c) estrone [E]: a dose of 13.5 μ g/kg estrone (50 nmol/kg; Sigma); (d) oleoyl-estrone [OE]: a dose of 5.4 mg/kg oleoyl-estrone (10 μ mol/kg; OED, Barcelona, Spain); and (e) oleoyl-estrone plus tamoxifen [OE-T]: a dose of 5.4 mg/kg oleoyl-estrone (10 μ mol) and 0.40 mg/kg tamoxifen (1.35 mmol).

On day 10, the rats were killed by decapitation. Blood was recovered and used to obtain plasma, which was kept frozen.

The carcasses were cleaned of the stomach and intestinal contents, sealed in polyethylene bags, autoclaved, and homogenized. Rat paste content in water, lipid, and protein was estimated as previously described [5]. Plasma samples were used for the estimation of glucose (Trinder glucose kit, Sigma) and triacylglycerol levels (kit 11528 Biosystems, Barcelona, Spain). Estrone sulphate (kit D5L-4800 Diagnostic Systems Laboratory, Webster TX, USA), estradiol (kit D5L-5400 Diagnostic Systems Laboratory), and oleoyl-estrone [23] levels were also measured in the plasma samples.

Statistical comparison between groups was carried out using a one-way ANOVA program and the post-hoc Duncan test.

3. Results

Table 1 shows the changes in body mass and composition of male Wistar rats receiving oleoyl-estrone, estrone, and tamoxifen. E induced a higher increase in body weight than the control, whereas, all other groups showed significant decreases, maximal in the two groups receiving OE. Food intake over 10 days followed a similar pattern, with higher food consumption in E and lowest in OE and OE-T.

The percentage of body lipid on day 10 was lowest in OE. There was a net lipid accrual in E, positive, but no significant accrual in C and decreases in all other groups; the loss of lipid was more marked in the OE group, with values similar for T and OE-T. No significant changes in water content were observed. Accrual changes paralleled those in body weight. No significant differences were found either in the percentage of protein, except for the E rats, which increased their initial protein pool; OE and OE-T rats lost small but significant amounts of protein. Controls, consequently, increased their energy content; E rats accrued even more energy than controls. However, the rats in the OE, T and OE-T groups lost up to 1/5th of their initial energy content.

The overall energy balance of male Wistar rats receiving oleoyl-estrone, estrone, and tamoxifen is presented in Table 2. Energy expenditure was increased in E rats, unchanged in OE and T, and decreased in OE-T. In all, E rats showed increased energy expenditure and accrual, sustained by a grossly increased energy intake. OE rats showed a markedly decreased food intake, which combined with unchanged energy expenditure, resulted in a massive loss of body energy stores. In T rats, the decrease in food intake, less marked than in OE, combined with the slightly lower energy expenditure, induced a net loss of energy less marked than in the OE group. Finally, the OE-T rats showed a marked decrease in energy ingested similar to the OE group, which was partly compensated by a marked decrease in energy expenditure, resulting in discrete losses of internal energy stores fully comparable to those of the T group.

Table 3 shows that no significant changes were observed in glucose and triacylglycerol levels between the groups studied in spite of the deep changes in energy balance. The levels

Table 1
Body composition of male Wistar rats treated with oleoyl-estrone, estrone, and tamoxifen

| Parameter | C | E | OE | T | OE-T | P |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| BW Increase (g/10 d) | 22.4 ± 2.4 ^A | 41.3 ± 3.5 ^B | -29.6 ± 1.7 ^C | -13.7 ± 2.9 ^D | -25.3 ± 1.7 ^C | 0.000 |
| Food intake (g/d) | 21.1 ± 0.1 ^A | 25.1 ± 0.4 ^B | 14.4 ± 0.9 ^C | 15.6 ± 0.7 ^D | 13.6 ± 0.2 ^C | 0.000 |
| Body lipid (%) | 13.05 ± 1.05 ^A | 13.16 ± 0.81 ^A | 8.81 ± 0.84 ^B | 10.14 ± 0.91 ^{AB} | 10.76 ± 1.38 ^{AB} | 0.112 |
| Lipid accrual (g/10 d) | 2.6 ± 3.0 ^A | 5.7 ± 1.6 ^A | -15.0 ± 2.1 ^B | -9.8 ± 2.6 ^B | -9.3 ± 3.5 ^B | 0.000 |
| Body water (%) | 61 ± 1 ^A | 62 ± 1 ^A | 63 ± 0 ^A | 63 ± 1 ^A | 63 ± 1 ^A | 0.388 |
| Water accrual (g/10 d) | 12.8 ± 4.3 ^A | 29.9 ± 1.2 ^B | -9.5 ± 1.4 ^C | -2.2 ± 2.8 ^C | -8.7 ± 4.6 ^C | 0.000 |
| Body protein (%) | 19.4 ± 0.8 ^A | 17.7 ± 0.4 ^B | 20.0 ± 0.3 ^A | 20.3 ± 0.3 ^A | 19.8 ± 0.4 ^A | 0.002 |
| Protein accrual (g/10 d) | 4.0 ± 2.4 ^A | 2.8 ± 0.5 ^A | -3.9 ± 0.7 ^B | 0.2 ± 1.0 ^{AB} | -3.8 ± 1.3 ^B | 0.001 |
| Body energy (kJ/g) | 10.03 ± 0.39 ^A | 9.95 ± 0.41 ^A | 8.81 ± 0.32 ^A | 9.24 ± 0.46 ^A | 9.51 ± 0.46 ^A | 0.307 |
| Energy accrual (kJ/10 d) | 207 ± 105 ^A | 346 ± 109 ^A | -609 ± 72 ^B | -347 ± 140 ^B | -380 ± 124 ^B | 0.000 |

C = Control (oil gavage alone); E = estrone 50 nmol/kg d; OE = oleoyl-estrone 10 mol/kg d; T = tamoxifen 0.40 mg/kg d; OE-T = oleoyl-estrone 10 mol/kg d and tamoxifen 0.40 mg/kg d. Data are the mean ± S.E.M. of six animals per group. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and post-hoc Duncan test; different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between the groups.

Table 2
Energy balance of male Wistar rats treated with oleoyl-estrone, estrone, and tamoxifen

| Parameter | C | E | OE | T | OE-T | P |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| Energy accrual (W) | 0.24 ± 0.12 ^A | 0.49 ± 0.14 ^A | -0.70 ± 0.08 ^B | -0.40 ± 0.16 ^{AB} | -0.44 ± 0.14 ^{AB} | 0.000 |
| Energy intake (W) | 3.23 ± 0.04 ^A | 3.95 ± 0.03 ^B | 2.18 ± 0.06 ^C | 2.40 ± 0.04 ^D | 2.09 ± 0.01 ^C | 0.000 |
| Energy expenditure (W) | 2.99 ± 0.12 ^A | 3.46 ± 0.12 ^B | 2.89 ± 0.09 ^{AC} | 2.80 ± 0.16 ^{AC} | 2.53 ± 0.14 ^C | 0.000 |

C = Control (oil gavage alone); E = estrone 50 nmol/kg d; OE = oleoyl-estrone 10 mol/kg d; T = tamoxifen 0.40 mg/kg d; OE-T = oleoyl-estrone 10 mol/kg d and tamoxifen 0.40 mg/kg d. Data are the mean ± S.E.M. of six animals per group. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and post-hoc Duncan test; different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between the groups. Energy accrual was calculated from the differences in body energy content; energy intake is a correlate of food intake, and energy expenditure was calculated as the difference between energy intake and energy accrual.

of estrone sulphate were considerably raised over the control baseline in the OE and OE-T groups, but not in the T group. Circulating acyl-estrone levels were similar in all groups except for the E rats, which showed distinctly reduced values.

4. Discussion

The effects of estrone and oleoyl-estrone on body lipid and energy balance were markedly different [1,5,24], which reinforces the assumption that oleoyl-estrone effects are not directly mediated by estrone. The presence of tamoxifen did not prevent the fat mobilizing effects of oleoyl-estrone, which may suggest that inhibition of the estrogen receptor did not prevent oleoyl-estrone actions. However, tamoxifen alone induced a significant, albeit smaller, loss of fat and a decrease in food intake similar to oleoyl-estrone alone. These effects were non additive since the combination of both compounds did not result in additional losses of fat.

The fact that tamoxifen is assumed to be an agonist/antagonist for the estrogen receptor [17–19] cannot directly explain its effects upon the energy balance of rats. The “independent” effects of tamoxifen on energy expenditure can be summarized by decreased appetite and slightly decreased energy expenditure, a pattern that does not correspond with the effects of estrone [1]. Estradiol moderately decreases food intake, essentially through modulation of satiety signals and not by directly acting upon appetite modulation [25,26]. Pharmacological doses of tamoxifen often result in accumulation of fat in the liver [19,27], a consequence of unwanted alteration of the estrogen-induced increase in lipid mobilization [12]. However, tamoxifen has been reported to increase lipid mobilization in rats and decrease appetite [18] as in the present study.

Oleoyl-estrone, on the other hand, induced a similar pattern of lipid mobilization, the main difference with tamoxifen (or both compounds combined) being the effects on energy expenditure, characteristically negligible in oleoyl-estrone-

Table 3
Plasma metabolites and hormones of male Wistar rats treated with oleoyl-estrone, estrone, and tamoxifen

| Parameter | C | E | OE | T | OE-T | P |
|-----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------|
| Triacylglycerols (mM) | 1.7 ± 0.2 ^A | 1.8 ± 0.1 ^A | 1.4 ± 0.1 ^A | 1.8 ± 0.2 ^A | 1.6 ± 0.2 ^A | 0.335 |
| Glucose (mM) | 6.8 ± 0.2 ^A | 7.0 ± 0.2 ^A | 7.3 ± 0.1 ^A | 6.8 ± 0.3 ^A | 6.9 ± 0.2 ^A | 0.557 |
| Estrone sulphate (nM) | 2.9 ± 0.9 ^A | 3.7 ± 0.5 ^A | 35.9 ± 14.2 ^B | 8.0 ± 2.3 ^A | 37.9 ± 7.1 ^B | 0.002 |
| Acyl-estrone (nM) | 163 ± 23 ^A | 87 ± 21 ^B | 155 ± 8 ^A | 136 ± 8 ^A | 142 ± 12 ^A | 0.016 |
| Estradiol (pM) | <70 ^A | <70 ^A | 288 ± 94 ^B | <70 ^A | 292 ± 37 ^B | 0.000 |

C = control (oil gavage alone); E = estrone 50 nmol/kg d; OE = oleoyl-estrone 10 μmol/kg d; T = tamoxifen 0.40 mg/kg d; OE-T = oleoyl-estrone 10 μmol/kg d and tamoxifen 0.40 mg/kg d. Data are the mean ± S.E.M. of six animals per group. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and post-hoc Duncan test; different superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between the groups.

treated animals [3]. The decrease in lipid mobilization observed in OE-T rats can be a consequence of decreased energy expenditure induced by tamoxifen or the combination of this drug and oleoyl-estrone. The reversed effects of estrone and oleoyl-estrone on energy balance preclude estrone as the mediator of oleoyl-estrone effects. However, this does not rule out estradiol, which is known to help mobilize lipids and decrease appetite [12,28]. However, the lack of effects of oleoyl-estrone treatment on ovarian and uterine weight, on mammary gland development, and on actual increases in estradiol levels in female rats [8] seem to preclude this mediation too. The high levels of estradiol observed in this study can be partly explained by the male-rat model used since males are relatively unprepared for disposal of excess estrogen, and both estrogen and tamoxifen effects are largely gender-dependent [29,30]; in any case, estradiol levels are well within the physiological range for females and could not alone explain the marked effects observed on energy balance. In fact, the increase in estrone sulphate levels was much more marked, and we did not observe “estrone” effects in OE rats as in the E group, elicited with much lower values.

Since the effects found in this study attributable to tamoxifen alone may agree with a possible agonistic action of the drug upon the estrogen receptor, we could safely assume that the combination of tamoxifen (acting as agonist) and oleoyl-estrone-generated estradiol (acting as an agonist too) on the estrogen receptor would result in an additive effect, which is not the case. The data available, however, do not definitively preclude the possible interaction of oleoyl-estrone and the estrogen receptors, and comparison with other more specific estrogen receptor blockers than tamoxifen should be investigated. If we assume that tamoxifen acted by blocking the estrogen receptor and thus, impeding the eventual action of oleoyl-estrone-derived estradiol, then the consequences are even more clear; oleoyl-estrone effect on appetite and body lipid were not diminished by the presence of tamoxifen. These results agree with the working hypothesis that the metabolic effects of oleoyl-estrone are not a consequence of direct stimulation of estrogen receptors by oleoyl-estrone; and are neither mediated through its conversion to estrone nor other estrogen acting on the estrogen receptor.

The question of tamoxifen partly mimicking the slimming effects of oleoyl-estrone, however, remains unresolved, hinting at actions modulated through pathways different from those of estrogen [31]. The results suggest that, at high doses, tamoxifen may decrease appetite and increase fat mobilisation. This could be speculatively explained by a possible agonistic effect acting through the same signalling pathway than oleoyl-estrone. The fact that oleoyl-estrone and tamoxifen induced similar (but not identical) effects of a non-additive nature hint towards a mechanism of action at least partially shared, that could be obscured by the well-known effects of tamoxifen on the estrogen receptor. The similarity of structure of tamoxifen and oleoyl-diethyl-stilbestrol, a powerful estrogen and also an oleoyl-estrone synthetic analogue [22] may

add to that hypothesis. However, additional work is needed to unravel the observed effects of tamoxifen.

Acknowledgements

This research was carried out with grants 01/1300 and 01/309 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias and AGL2000-0780 from the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias of the Government of Spain.

References

- [1] Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, et al. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes* 1996;20:588–94.
- [2] Remesar X, Guijarro P, Torregrosa C, Grasa MM, López J, Fernández-López JA, et al. Oral oleoyl-estrone induces the rapid loss of body fat in Zucker lean rats fed a hyperlipidic diet. *Int J Obes* 2000;24:1405–12.
- [3] Sanchis D, Balada F, Picó C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, et al. Rats receiving the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Arch Physiol Biochem* 1997;105:663–72.
- [4] Alemany M, Fernández-López JA, Petrobelli A, Granada M, Foz M, Remesar X. Pérdida de peso en un paciente con obesidad mórbida en tratamiento con oleoil-estrone. *Med Clin* 2003;121:496–9.
- [5] Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay MT, et al. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res* 2001;9:202–9.
- [6] Esteve M, Savall P, Blay MT, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Intestinal handling of an oral oleoyl-estrone gavage by the rat. *Life Sci* 2001;69:763–77.
- [7] Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Monserrat C, Fernández-López JA, et al. Short-term handling of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) by the rat. *Mol Cell Biochem* 1997;177:153–7.
- [8] Cabot C, Grasa MM, Massanés RM, de Matteis R, Cinti S, Fernández-López JA, et al. Oleoyl-estrone does not have direct estrogenic effects on rats. *Life Sci* 2001;69:749–61.
- [9] Dubuc PU. Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985;180:468–73.
- [10] Gavin ML, Gray JM, Johnson PR. Estrogen-induced effects on food intake and body weight in ovariectomized, partially lipectomized rats. *Physiol Behav* 1984;32:55–9.
- [11] Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1994;134:2367–70.
- [12] Anderson LA, McTernan PG, Barnett AH, Kumar S. The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: Influence of gender and site. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5045–51.
- [13] Sutter-Dub MT. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* 2002;67:77–93.
- [14] Hamosh M, Hamosh P. The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest* 1975;5:1132–5.
- [15] Price TM, O'Brien SN, Welter BH, George R, Anandjiwala J, Kilgore M. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase—possible mechanism of body fat distribution. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:101–7.

- [16] Wade GN, Powers JB. Tamoxifen antagonizes the effects of estradiol on energy balance and estrous behavior in Syrian hamsters. *Am J Physiol* 1993;265:R559–62.
- [17] Friedman ZY. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of tamoxifen action. *Cancer Invest* 1998;16:391–6.
- [18] Wade GN, Heller HW. Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. *Am J Physiol* 1993;264:R1219–23.
- [19] Ogawa Y, Murata Y, Nishioka A, Inomata T, Yoshida S. Tamoxifen-induced fatty liver in patients with breast cancer. *Lancet* 1998;351:725.
- [20] Nishino M, Hayakawa K, Nakamura Y, Morimoto T, Mukaihara S. Effects of tamoxifen on hepatic fat content and the development of hepatic steatosis in patients with breast cancer: high frequency of involvement and rapid reversal after completion of tamoxifen therapy. *Am J Roentgenol* 2003;180:129–34.
- [21] Virgili J, Casals I, Peinado-Onsurbe J, Esteve M, JulveGil J, Fernández-López JA, et al. Distribution of oleoyl-estrone in rat plasma lipoproteins. *Horm Metabol Res* 1999;31:597–601.
- [22] Sanchis D, Balada F, Farrerons C, Virgili J, Grasa MM, Adán C, et al. Structural determinants of oleoyl-estrone slimming effects. *Life Sci* 1998;62:1349–59.
- [23] Ardévol A, Virgili J, Sanchis D, Adán C, Fernández-Real JM, Fernández-López JA, et al. A method for the measurement of plasma estrone fatty ester levels. *Anal Biochem* 1997;249:247–50.
- [24] Remesar X, Tang V, Ferrer E, Torregrosa C, Virgili J, Masanés RM, et al. Estrone in food: a factor influencing the development of obesity? *Eur J Nutr* 1999;38:247–53.
- [25] Geary N. Estradiol and appetite. *Appetite* 2000;35:273–4.
- [26] Rocha M, Grueso E, Puerta M. The anorectic effect of oestradiol does not involve changes in plasma and cerebrospinal fluid leptin concentrations in the rat. *J Endocrinol* 2001;171:349–54.
- [27] Ali PA, al Ghorabie FH, Evans CJ, el Sharkawi AM, Hancock DA. Body composition measurements using DXA and other techniques in tamoxifen-treated patients. *Appl Radiat Isotop* 1998;49:643–5.
- [28] Thompson ME, Cox VC. The effects of estradiol on body weight and food intake in normal weight VMH-lesioned rats. *Physiol Behav* 1979;22:627–9.
- [29] Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *J Nutr* 2001;131:2351–7.
- [30] Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Body weight and food intake profiles are modulated by sex hormones and tamoxifen in chronically hypertensive rats. *J Nutr* 2002;132:2246–50.
- [31] Colletta AA, Benson JR, Baum M. Alternative mechanisms of action of anti-oestrogens. *Breast Cancer Res Treat* 1994;31:5–9.

***3. Effects of oleoyl-estrone with dexfenfluramine, sibutramine or
phentermine on overweight rats***

Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernández-López, Remesar X, Alemany M. *European Journal of Pharmacology*,
513: 243-248, 2005.

Effects of oleoyl-estrone with dexfenfluramine, sibutramine or phentermine on overweight rats

Raquel Ferrer-Lorente, Cristina Cabot, José-Antonio Fernández-López,
Xavier Remesar, Marià Alemany*

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain

Received 16 September 2004; received in revised form 26 November 2004; accepted 25 February 2005
Available online 14 April 2005

Abstract

We studied the combination of oleoyl-estrone with either dexfenfluramine, sibutramine or phentermine in overweight male rats treated for 10 days in order to determine whether they shared a mechanism of action. Oleoyl-estrone, dexfenfluramine and sibutramine decreased body weight and energy (essentially lipids); losses were higher when combined with oleoyl-estrone. Glycemia was maintained except under phentermine; oleoyl-estrone induced decreases in triacylglycerols, cholesterol, insulin and HOMA (homeostasis model assessment). Combination of oleoyl-estrone and sibutramine resulted in the loss of up to 29% body energy in 10 days. Energy expenditure was maintained. The effects of oleoyl-estrone and dexfenfluramine or sibutramine on appetite were substantially additive. All oleoyl-estrone-treated rats showed increased insulin sensitivity. In conclusion, combined treatment of overweight rats with oleoyl-estrone and sibutramine or dexfenfluramine results in a dramatic loss of weight and fat, whilst maintaining circulating energy homeostasis.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Obesity; Overweight; Energy balance; Oleoyl-estrone; Dexfenfluramine; Sibutramine; Phentermine

1. Introduction

Oleoyl-estrone decreases the body weight of normal-weight (Grasa et al., 2001a) and obese rats (Grasa et al., 2001b) or obese humans (Alemany et al., 2003), by inducing adipose tissue wasting (Remesar et al., 2002); it maintains glucose homeostasis by decreasing insulin resistance (Grasa et al., 2001a) and favouring the alternative use of fat from internal stores as fuel for metabolic activity (Sanchis et al., 1990). Oleoyl-estrone also lowers the ponderostat setting (Adán et al., 1999), decreases food intake and maintains energy expenditure, thus creating a energy gap fulfilled by the mobilisation of the fat depots (Sanchis et al., 1990).

In conjunction with diet, dexfenfluramine induced the loss of excess weight in humans (Finer et al., 1987) and

rodents (Beynen et al., 1986). Its main metabolic effect was the significant decrease in appetite (Blundell and Hill, 1992), elicited by its inhibition of serotonin reuptake in the brain (Turner, 1990). The association of dexfenfluramine with a thermogenic drug resulted in the enhancement of their separate slimming effectiveness (Wellman and Maher, 1999), but also surfaced a number of unwanted secondary effects of dexfenfluramine (Sachdev et al., 2002; Rich et al., 2003) that resulted in its removal from the market. However, the concept of association of drugs acting on different components of the equation of energy equilibrium, favouring the wasting of reserves may constitute a significant step in the development of pharmacological strategies for the treatment of obesity (Fernández-López et al., 2002).

Sibutramine (Bray and Greenway, 1999) is one of the few anti-obesity drugs now available in the market. It is widely used for the treatment of human overweight and non severe obesity (Ryan, 2004) as a complement of hypocaloric diets. Sibutramine acts inhibiting the synaptic reuptake of both serotonin and noradrenaline (Heal et al., 1998).

* Corresponding author. Tel.: +34 93 403 46 06; fax: +34 93 403 70 64.
E-mail address: malemany@ub.edu (M. Alemany).

Sibutramine decreases food intake and enhances energy expenditure (Hansen et al., 1999) through modulation of the efferent signals from the brain (Finer, 2002).

Phentermine is widely used as thermogenic drug (Arch, 1981), since it increases the availability of noradrenaline (Zychlinski and Montgomery, 1984), at least in part by inhibiting its reuptake (Samanin and Garattini, 1993). Its pharmacological effects decreasing body fat are limited (Mancini, 2003) and has been used in conjunction with other antiobesity drugs (Wellman and Maher, 1999) despite its adrenergic secondary effects (Jollis et al., 2000).

Oleoyl-estrone mobilises body fat, decreasing adipose tissue cellularity and cell size (Remesar et al., 2002); in addition, it decreases food intake. Since the precise mechanism of its modulation of appetite is unknown, we have studied the combination of oleoyl-estrone with either dexfenfluramine, sibutramine or phentermine in order to (a) determine whether the effects on food intake of oleoyl-estrone and the drugs acting on the food intake-controlling serotonin/noradrenaline pathways are additive or superimposable (i.e., they share totally or partially a mechanism of action) and (b) whether the combined administration of oleoyl-estrone and these anti-obesity drugs increases their effectiveness for the mobilisation of body reserves.

2. Materials and methods

Male Wistar rats (Harlan-Interfauna, Sant Feliu de Codines, Spain) of 45 days were used; they weighed initially 190–220 g. The rats were maintained in a controlled environment: 21.5–22.5 °C; 80% relative humidity; lights on from 08:00 to 20:00; they were kept in collective cages and were fed for 5 weeks a reduced cafeteria diet (Balada et al., 1997) ad libitum. At the end of this phase, the animals were already overweight. The rats were re-conditioned during an additional week with standard rat chow ad libitum (maintenance chow, Panlab, Barcelona, Spain) as sole food. They were used in the ensuing experiment at this point, when their age was 90 days.

The experimental setup and procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona. All animal handling procedures were carried out following the guidelines established by the EU and the Spanish and Catalan Governments.

All animals received a daily gavage of 0.2 mL sunflower oil at the beginning of the light cycle and were maintained under standard conditions with full access to food pellets; their weights and food consumption were recorded daily. Eight groups of six animals were randomly selected: (a) controls; (b) oleoyl-estrone OE; (c) dexfenfluramine; (d) dexfenfluramine and oleoyl-estrone; (e) sibutramine; (f) sibutramine and oleoyl-estrone; (g) phentermine; and (h) phentermine and oleoyl-estrone. The gavage of rats in the control group contained only oil. The rats in the groups b, d, f and h were given a daily gavage containing oleoyl-estrone

(OED, Barcelona, Spain), at a dose of 10 µmol/kg. Immediately after the oil gavage, groups c and d received a second gavage of 0.2 mL of a suspension of dexfenfluramine (Pharma Chem Lansheng Corp., Shanghai, China) in water at a daily dose of 3.0 mg/kg; groups e and f received a second gavage of 0.2 mL of a suspension of sibutramine (Pharma Chem Lansheng Corp.) in water at a daily dose of 5.0 mg/kg; and groups g and h received a second gavage of 0.2 mL of a suspension of phentermine (Sigma, St. Louis, MO, USA) in water at a daily dose of 5.0 mg/kg.

The treatments continued for 10 days. At the end of the experiment, the rats were killed by decapitation. Blood was received in dry beakers and allowed to clot. The serum was stored at –80 °C until processed. The rats were dissected, and the stomach and intestinal contents were removed; the carcass and organs (including the unused blood and packed blood cells) were sealed in polyethylene bags, autoclaved, and thoroughly homogenised (Grasa et al., 2001a). The rat paste was used for the estimation of lipid (Folch et al., 1957), and energy content, using a bomb calorimeter (C-7000 Ika, Heitersheim, Germany). Paste composition was related to *in vivo* weight correcting by digestive canal contents. The percentage body composition of controls was used to estimate the absolute lipid and energy content of the rats at the beginning of the experiment by applying these values to their known initial weights. The measured body weight and composition of the rats at the end of the study were used to determine the changes in body size and composition occurred during the 10 days of treatment.

Daily food intake in each cage was measured, and the mean food consumption of individual rats was estimated. Energy intake was calculated from the energy content of the food pellets and food intake. Rat chow had a mean energy content (bomb calorimeter) of 16.37 ± 0.04 kJ/g; this translated into a mean metabolisable energy of 13.3 kJ/g when discounting non-metabolisable fibre and assuming 95% efficiency in nutrient assimilation. Energy accrual was the difference between estimated energy on day 0 and the measured energy content (bomb calorimeter) on day 10. Mean energy expenditure was estimated as the difference between energy intake and net energy accrual.

Blood serum was used for the measurement of glucose (Trinder kit, Sigma, St. Louis, MO, USA), non-esterified fatty acids (NEFA kit, Wako Chemicals, Neuss, Germany), 3-hydroxybutyrate (kit 907979, Roche, Mannheim, Germany), total triacylglycerols (kit 11528, Biosystems, Barcelona, Spain), total cholesterol (Cholesterol reagent easy, Menarini, Firenze Italy), aspartate transaminase (Infinity AST reagent 51-25, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) and alanine transaminase (Infinity ALT reagent 52-25, Sigma Diagnostics), as well as insulin (SRI-13 K, Linco, St. Charles, MO, USA). The HOMA (homeostasis model assessment) score (Matthews et al., 1985; Bonora et al., 2000) was calculated from the insulin and glucose data for each rat.

Statistical comparisons between groups were established by two-way analysis of variance programs.

3. Results

Fig. 1 shows the changes in body weight of the rats treated with oleoyl-estrone and/or dexfenfluramine, sibutramine or phentermine. The initial weights in the different experimental groups were controls 364 ± 14 g, oleoyl-estrone 356 ± 10 g, dexfenfluramine 360 ± 8 g, dexfenfluramine+oleoyl-estrone 360 ± 13 g, sibutramine 373 ± 13 g, sibutramine+oleoyl-estrone 368 ± 16 g, phentermine 374 ± 12 g and phentermine+oleoyl-estrone 374 ± 11 g. Controls increased slightly their weight in 10 days at a rate of less than 0.2% per day. The rats receiving dexfenfluramine or sibutramine lost weight at a rate lower than 0.4% per day; phentermine-treated rats did not lose weight at all. Oleoyl-estrone resulted in losses of about 0.8% per day, a value comparable to that obtained with the phentermine plus oleoyl-estrone treatment; the combination of oleoyl-estrone with sibutramine further accelerated the loss to 1.0% per day, and the combination with dexfenfluramine resulted in a loss of 1.1% per day. The effect of oleoyl-estrone on body weight was statistically significant, and the association with dexfenfluramine or sibutramine was also significantly different from the effects of these drugs alone; phentermine did not change body weight, but in combination with oleoyl-estrone the loss of body weight was comparable to that of oleoyl-estrone alone.

The analysis of body energy content is shown in Table 1. The energy content of the different groups followed the pattern outlined for body weight. The loss of lipid was in the range of 17–29% in all treated groups (except in the phentermine group) compared with controls: the sibutramine+oleoyl-estrone rats lost 29% of its lipid in just 10 days. Food intake decreased in all treated groups except for the phentermine group, maximally in the rats receiving oleoyl-estrone and either dexfenfluramine or sibutramine (i.e., a decrease of 43–47% in food intake vs. controls). No differences in the behaviour of the rats from the groups studied were observed, except for altered food intake.

Fig. 2 presents the energy balances of all groups. There were no significant differences in energy expenditure between all the groups. Since there was a lower energy intake in the sibutramine, dexfenfluramine, and all oleoyl-estrone-treated rats, energy expenditure was maintained in these groups at the expense of internal energy sources. Lipids accounted for most of this internal energy (67–98%; *P* values were significant for the effect of oleoyl-estrone, dexfenfluramine and sibutramine, but not for phentermine); in contrast, the contribution of all other internal energy sources (i.e., protein or glycogen) were not significant for any of the compounds tested.

Except for a decrease induced by dexfenfluramine, no significant effects were observed in the glucose levels

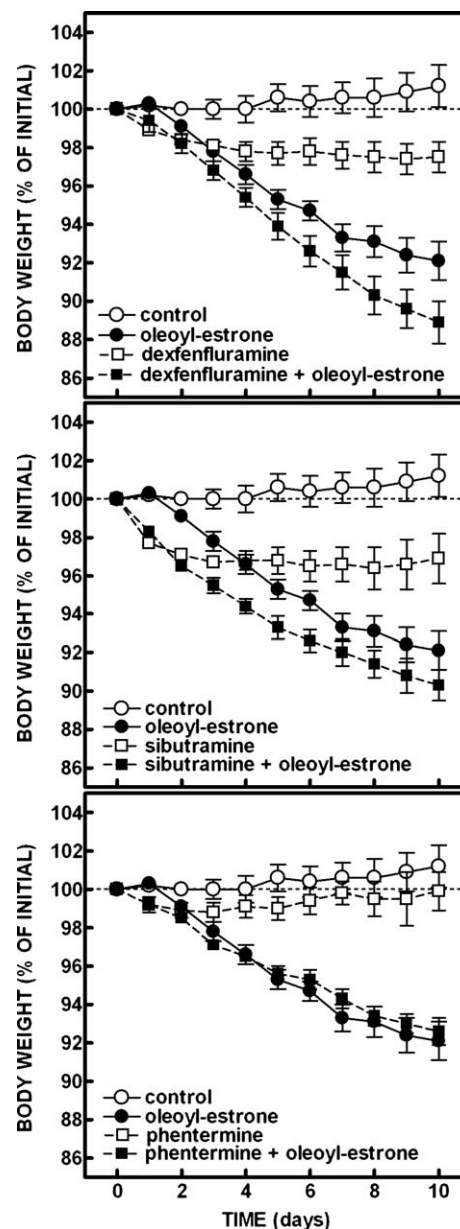


Fig. 1. Body weight change of overweight male Wistar rats receiving a daily oral dose of oleoyl-estrone and/or sibutramine or dexfenfluramine. The data are the mean \pm S.E.M. of six different animals and are expressed as percent of the initial body weight. Upper panel: controls and oleoyl-estrone treated rats compared with dexfenfluramine and dexfenfluramine+oleoyl-estrone-treated rats. Center panel: controls and oleoyl-estrone treated rats compared with sibutramine and sibutramine+oleoyl-estrone-treated rats. Lower panel: controls and oleoyl-estrone treated rats compared with phentermine and phentermine+oleoyl-estrone-treated rats. Statistical significance of the differences between groups (analysis of the variance); NS=not statistically significant ($P>0.05$):

| <i>P</i> values | Effect of oleoyl-estrone | Effect of dexfenfluramine | Effect of sibutramine | Effect of phentermine |
|-------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Final body weight | <0.001 | 0.009 | 0.011 | NS |

Table 1

Body composition on day 10 and food intake of rats treated with oleoyl-estrone and dexfenfluramine, sibutramine or phentermine

| Parameter | Units | Gavage | Controls | Dexfenfluramine | Sibutramine | Phentermine | <i>P</i> OE | <i>P</i> DX | <i>P</i> SB | <i>P</i> PH |
|---------------------|--------------------|--------|--------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Body energy density | kJ/g | −OE | 11.73 ± 0.49 | 10.08 ± 0.48 | 10.69 ± 0.45 | 11.56 ± 0.45 | | | | |
| | | +OE | 10.63 ± 0.07 | 10.30 ± 0.45 | 10.14 ± 0.45 | 10.19 ± 0.69 | NS | 0.042 | NS | NS |
| Body energy content | MJ | −OE | 4.35 ± 0.29 | 3.55 ± 0.20 | 3.87 ± 0.25 | 4.46 ± 0.37 | | | | |
| | | +OE | 3.51 ± 0.08 | 3.32 ± 0.21 | 3.21 ± 0.29 | 3.51 ± 0.18 | 0.001 | 0.037 | NS | NS |
| Body lipid | % BW | −OE | 17.2 ± 1.1 | 14.1 ± 1.4 | 14.2 ± 1.9 | 18.7 ± 1.6 | | | | |
| | | +OE | 15.3 ± 0.7 | 14.5 ± 1.9 | 13.6 ± 1.1 | 14.3 ± 1.0 | NS | NS | NS | NS |
| Body lipid pool | g | −OE | 63.8 ± 5.0 | 49.7 ± 5.5 | 51.5 ± 7.2 | 71.3 ± 5.6 | | | | |
| | | +OE | 50.4 ± 1.3 | 47.0 ± 7.3 | 43.4 ± 5.2 | 50.0 ± 4.8 | 0.009 | NS | NS | NS |
| Body lipid change | % of initial lipid | −OE | 0.6 ± 5.5 | −20.2 ± 7.8 | −20.7 ± 9.7 | 8.3 ± 9.5 | | | | |
| | | +OE | −17.5 ± 3.7 | −24.7 ± 10.6 | −28.5 ± 5.9 | −23.0 ± 5.3 | 0.010 | NS | 0.039 | NS |
| Food intake | g/day | −OE | 16.6 ± 0.1 | 13.3 ± 0.7 | 12.4 ± 0.7 | 16.9 ± 0.4 | | | | |
| | | +OE | 11.6 ± 0.6 | 8.7 ± 0.7 | 9.5 ± 0.8 | 12.3 ± 0.4 | <0.001 | 0.003 | 0.003 | NS |
| | | | | | | | | | | |

The data are the mean ± S.E.M. of six animals per group. BW=body weight; ±OE plus/minus oleoyl-estrone in the gavage. Significance of the differences between groups (analysis of the variance); *P* values for the overall effects of oleoyl-estrone (*P* OE), dexfenfluramine (*P* DX), sibutramine (*P* SB), and phentermine (*P* PH). NS=not statistically significant (*P*>0.05). There were no significant interactions between the different treatments (analysis of the variance).

(Table 2). Insulin decreased by oleoyl-estrone treatment, no other drug affected this parameter. The maintenance of glycaemia and decrease in insulinaemia resulted in a

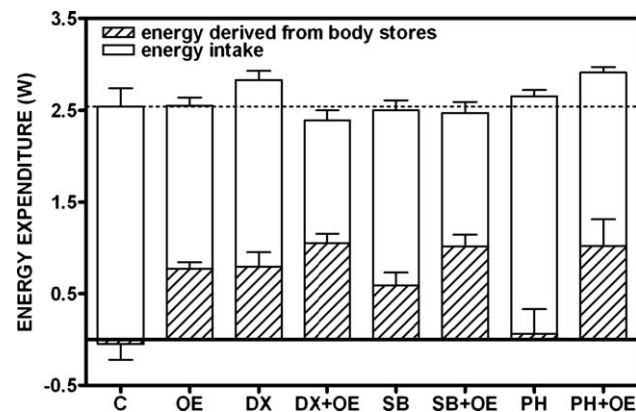


Fig. 2. Energy expenditure of overweight male Wistar rats receiving a daily oral dose of oleoyl-estrone and/or sibutramine or dexfenfluramine. The columns represent the calculated energy expenditure of six animals per group ± S.E.M. The contribution of food intake and internal energy stores is also indicated. The energy intake bar is stacked on top of that representing the energy derived from internal stores. The sum of both bars represents energy expenditure. All units have been converted into W (J/s): (food intake g × 13.3 kJ/g)/day for energy intake, and (energy accrual MJ)/10 days for decrements in body energy. C=controls; OE=oleoyl-estrone; DX=dexfenfluramine; DX+OE=dexfenfluramine+oleoyl-estrone; SB=sibutramine; SB+OE=sibutramine+oleoyl-estrone; PH=phentermine; PH+OE=phentermine+oleoyl-estrone. Statistical significance of the differences between groups (analysis of the variance); NS=not statistically significant (*P*>0.05):

| <i>P</i> values | Effect of oleoyl-estrone | Effect of dexfenfluramine | Effect of sibutramine | Effect of phentermine |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Energy expenditure | NS | NS | NS | NS |
| Energy intake | <0.001 | 0.003 | 0.003 | NS |
| Energy accrual | <0.001 | 0.002 | 0.007 | NS |

decrease in the HOMA score (i.e., higher insulin sensitivity) in all oleoyl-estrone-treated groups. Oleoyl-estrone treatment, alone or in combination with other drugs, decreased the triacylglycerol and cholesterol levels. Dexfenfluramine also decreased the levels of triacylglycerols and cholesterol, and these effects were additive to those induced by oleoyl-estrone. Dexfenfluramine also slightly increased the 3-hydroxybutyrate levels, a parameter unaffected by the other drugs tested.

No significant effects were observed on aspartate and alanine transaminase levels in serum induced by the treatments, single or combined, of oleoyl-estrone, dexfenfluramine or sibutramine; but phentermine induced an increase in alanine transaminase.

4. Discussion

The rats used in this study contained initially 17% lipid, which corresponds to about 21% of body weight as fat tissue, a condition that can be compared with human overweight (i.e., a body mass index in the range of 30 kg/m²). The fact that oleoyl-estrone combined with sibutramine resulted in the loss of more than one quarter of its body lipid in just 10 days, without implementing dietary constraints, suggests that the combination of both compounds may facilitate the swift loss of excess fat. Evidently, this is just a first approach to the additive combination of two drugs that have proved separately their efficacy, at least on animal models. The effects of dexfenfluramine and oleoyl-estrone were fully comparable to these, but the caveats that the combination of dexfenfluramine and phentermine carried about must be taken into account (Jollis et al., 2000); however, the lack of alteration of transaminase levels, the maintenance of glycaemia and the concentrations of lipid metabolism indicators in plasma, together with the lowering of insulin resistance (HOMA score) and decreased cholesterol levels suggest that—at least in the short period studied—

Table 2
Plasma composition of rats treated with oleoyl-estrone and dexfenfluramine, sibutramine or phentermine

| Parameter | Units | Gavage | Controls | Dexfenfluramine | Sibutramine | Phentermine | <i>P</i> OE | <i>P</i> DX | <i>P</i> SB | <i>P</i> PH |
|----------------------------|--------|--------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Glucose | mM | –OE | 8.23 ± 0.13 | 7.70 ± 0.20 | 8.21 ± 0.20 | 8.28 ± 0.26 | NS | <0.001 | NS | NS |
| | | +OE | 8.68 ± 0.17 | 7.66 ± 0.18 | 7.95 ± 0.28 | 8.15 ± 0.17 | | | | |
| Triacylglycerol | mM | –OE | 1.79 ± 0.09 | 1.71 ± 0.08 | 1.76 ± 0.05 | 1.83 ± 0.02 | <0.001 | 0.018 | NS | NS |
| | | +OE | 1.45 ± 0.20 | 0.91 ± 0.11 | 1.38 ± 0.15 | 1.38 ± 0.24 | | | | |
| 3-Hydroxybutyrate | μM | –OE | 127 ± 6 | 162 ± 13 | 110 ± 11 | 115 ± 10 | NS | 0.006 | NS | NS |
| | | +OE | 100 ± 13 | 130 ± 8 | 138 ± 22 | 130 ± 16 | | | | |
| Non-esterified fatty acids | μM | –OE | 422 ± 32 | 410 ± 58 | 349 ± 19 | 471 ± 35 | NS | NS | NS | NS |
| | | +OE | 454 ± 51 | 391 ± 33 | 392 ± 31 | 501 ± 51 | | | | |
| Total cholesterol | mM | –OE | 2.26 ± 0.16 | 2.05 ± 0.05 | 2.35 ± 0.18 | 2.12 ± 0.06 | <0.001 | 0.040 | NS | NS |
| | | +OE | 1.55 ± 0.06 | 1.35 ± 0.09 | 1.53 ± 0.09 | 1.46 ± 0.08 | | | | |
| Asp-transaminase | μkat/L | –OE | 2.07 ± 0.21 | 2.06 ± 0.23 | 1.77 ± 0.20 | 1.82 ± 0.24 | NS | NS | NS | NS |
| | | +OE | 1.88 ± 0.10 | 1.52 ± 0.33 | 1.42 ± 0.30 | 2.05 ± 0.10 | | | | |
| Ala-transaminase | nkat/L | –OE | 490 ± 50 | 467 ± 59 | 425 ± 27 | 563 ± 85 | NS | NS | NS | 0.037 |
| | | +OE | 374 ± 20 | 397 ± 22 | 556 ± 129 | 590 ± 90 | | | | |
| Insulin | pM | –OE | 561 ± 60 | 574 ± 73 | 442 ± 65 | 560 ± 88 | 0.011 | NS | NS | NS |
| | | +OE | 384 ± 49 | 435 ± 45 | 347 ± 57 | 494 ± 63 | | | | |
| HOMA score | | –OE | 28.6 ± 3.1 | 27.1 ± 2.9 | 22.8 ± 3.5 | 28.6 ± 4.4 | 0.012 | NS | NS | NS |
| | | +OE | 20.8 ± 2.9 | 20.8 ± 2.4 | 16.9 ± 2.8 | 25.0 ± 3.2 | | | | |

The data are the mean ± S.E.M. of six animals per group; ±OE plus/minus oleoyl-estrone in the gavage. Significance of the differences between groups (ANOVA): *P* values for the overall effects of oleoyl-estrone (*P* OE), dexfenfluramine (*P* DX), sibutramine (*P* SB), and phentermine (*P* PH). NS=not statistically significant (*P*>0.05). There were no significant interactions between the different treatments (analysis of the variance).

no significant metabolic alterations were observed, other than the loss of body energy and body weight. This is important, since a large part of the fat susceptible of elimination was already disposed of without the appearance of gross indications of damage or alteration of homeostatic control.

The combination of oleoyl-estrone with phentermine was much less effective, probably because phentermine alone had only limited effects on body energy: the effects of oleoyl-estrone on body energy were similar in the oleoyl-estrone and phentermine+oleoyl-estrone groups, while the combination of oleoyl-estrone and either dexfenfluramine or sibutramine induced additive effects on food consumption and, consequently, additive effects on body energy losses to maintain energy expenditure unchanged. Most of the energy lost came from lipid, since the changes in other energy components were not statistically significant; this is in agreement with the powerful lipid-mobilising effects, and protein sparing, of oleoyl-estrone (Grasa et al., 2001a) and also agree with the observed mainly lipids loss under sibutramine treatment (van Gaal et al., 1998).

The effects on food intake of oleoyl-estrone and dexfenfluramine or sibutramine were only partially additive, since the combinations of oleoyl-estrone and all other drugs yielded decreases in food intake that were 70–90% of the sum of the effects of the separate treatments. Since the effects of all treatments, alone or combined, did not affect significantly energy expenditure, the effects on food intake became the main factor for lipid mobilisation.

The nil effect of phentermine on food intake contrasts with the marked effects of both serotonin reuptake inhibitors studied (dexfenfluramine and sibutramine) and agree with food intake being controlled essentially by serotonergic pathways (Voigt et al., 2002). The additive

effect of oleoyl-estrone indicate that oleoyl-estrone does not act quite on appetite through the modulation of serotonin-controlled pathways, nor does it through modulation of neuropeptide Y (Cabot et al., 1998a) or corticotropin-releasing hormone (Cabot et al., 1998b). Since glycaemia is well maintained, it can be postulated that this maintenance may help decrease food intake, since normoglycaemia under conditions of increased sensitivity to glucose (as is the case in oleoyl-estrone-treated rats) inhibits food intake (Mayer, 1953).

Additional studies should be carried out to explore the safety and medium-/long-term effects on body weight of the combination of oleoyl-estrone and a serotonin reuptake-inhibiting drug such as sibutramine, but the additive results shown here are encouraging. In addition, oleoyl-estrone has been found to prevent or limit the recovery of the fat lost because of its resetting of the ponderostat (Adán et al., 1999), and on the other hand, sibutramine upholds the achieved loss of body weight only when drug treatment is combined with limited energy intake (James et al., 2000). The combination of sibutramine and oleoyl-estrone may help prevent the rapid recovery of the lost fat.

In conclusion, the combination of oleoyl-estrone with a serotonin reuptake inhibitor drug such as sibutramine results in a dramatic loss of body weight and body fat whilst maintaining circulating energy homeostasis in the overweight rat.

Acknowledgements

Funding by grants 01/1300 and 01/1309 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Government of Spain is gratefully acknowledged. Thanks are given to Robin

Rycroft from the SAL of the University of Barcelona for correction of the text.

References

- Adán, C., Cabot, C., Esteve, M., Grasa, M.M., Massanés, R., Vilà, R., Estruch, J., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 1999. Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *Int. J. Obesity* 22, 366–373.
- Alemany, M., Fernández-López, J.A., Pietrobelli, A., Granada, M., Foz, M., Remesar, X., 2003. Pérdida de peso en un paciente con obesidad mórbida en tratamiento con oleoil-estrone (Weight loss in a patient with morbid obesity under treatment with oleoyl-estrone). *Med. Clin.* 121, 496–499.
- Arch, J.R., 1981. The contribution of increased thermogenesis to the effect of anorectic drugs on body composition in mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 2763–2769.
- Balada, F., Sanchis, D., Virgili, J., Grasa, M.M., Monserrat, C., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 1997. Effect of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) on the body weight of rats fed a cafeteria diet. *Arch. Physiol. Biochem.* 105, 487–495.
- Beynen, A.C., Dekker, D., Gundlach, B.L., Vantintelen, G., 1986. Body composition of obese rats fed the anorectic drug dexfenfluramine. *Nutr. Rep. Int.* 33, 491–497.
- Blundell, J.E., Hill, A.J., 1992. Dexfenfluramine and appetite in humans. *Int. J. Obesity* 16, S51–S59.
- Bonora, E., Saggiani, F., Targher, G., Zenere, M.B., Alberiche, M., Monauni, T., Bonadonna, R.C., Muggeo, M., 2000. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. Studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23, 57–63.
- Bray, G.A., Greenway, F.L., 1999. Current and potential drugs for treatment of obesity. *Endocr. Rev.* 20, 805–875.
- Cabot, C., Grasa, M.M., Adán, C., Pérez-Clausell, J., Virgili, J., Estruch, J., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 1998a. Oleoyl-estrone does not alter hypothalamic neuropeptide Y. *Peptides* 19, 1631–1635.
- Cabot, C., Grasa, M.M., Estruch, J., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 1998b. Zucker obese rats are insensitive to the CRH-increasing effect of oleoyl-estrone. *Brain Res. Bull.* 46, 529–534.
- Fernández-López, J.A., Remesar, X., Foz, M., Alemany, M., 2002. Pharmacological approaches for the treatment of obesity. *Drugs* 62, 915–944.
- Finer, N., 2002. Sibutramine: its mode of action and efficacy. *Int. J. Obesity* 26, S29–S33.
- Finer, N., Craddock, D., Lavielle, R., Keen, H., 1987. Prolonged weight-loss with dexfenfluramine treatment in obese patients. *Diabetes Metab.* 13, 598–602.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 232, 497–509.
- Grasa, M.M., Cabot, C., Esteve, M., Yubero, P., Massanés, R.M., Blay, M., Vilà, R., López-Martí, J., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2001a. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes. Res.* 9, 202–209.
- Grasa, M.M., Esteve, M., Massanés, R.M., Yubero, P., Blay, M., López-Martí, J., Cabot, C., Vilà, R., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2001b. Oral gavage of oleoyl-estrone has a stronger effect on body weight in male obese Zucker rats than in female. *Diabetes Obes. Metab.* 3, 203–208.
- Hansen, D.L., Toubro, S., Stock, M.J., Macdonald, I.A., Astrup, A., 1999. The effect of sibutramine on energy expenditure and appetite during chronic treatment without dietary restriction. *Int. J. Obesity* 23, 1016–1024.
- Heal, D.J., Aspley, S., Prow, M.R., Jackson, H.C., Martin, K.F., Cheetham, S.C., 1998. Sibutramine: a novel anti-obesity drug. A review of the pharmacological evidence to differentiate it from D-amphetamine and D-fenfluramine. *Int. J. Obesity* 22 (Suppl. 1), S18–S28.
- James, W.P.T., Astrup, A., Finer, N., Hilsted, J., Kopelman, P., Rössner, S., Saris, W.H.M., van Gaal, L., 2000. Effect of sibutramine on weight maintenance after weight loss: a randomised trial. *Lancet* 356, 2119–2125.
- Jollis, J.G., Landolfo, C.K., Kisslo, J., Constantine, G.D., Davis, K.D., Ryan, T., 2000. Fenfluramine and phentermine and cardiovascular findings—effect of treatment duration on prevalence of valve abnormalities. *Circulation* 101, 2071–2077.
- Mancini, H.A., 2003. Treatment of obesity: an update on anti-obesity medications. *Obes. Rev.* 4, 25–42.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Teacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 28, 412–419.
- Mayer, J., 1953. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N. Engl. J. Med.* 249, 13–16.
- Remesar, X., Fernández-López, J.A., Blay, M.T., Savall, P., Salas, A., Díaz-Silva, M., Esteve, M., Grasa, M.M., Alemany, M., 2002. Effect of oral oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int. J. Obesity* 26, 1092–1102.
- Rich, S., Shillington, A., McLaughlin, V., 2003. Comparison of survival in patients with pulmonary hypertension associated with fenfluramine to patients with primary pulmonary hypertension. *Am. J. Cardiol.* 92, 1366–1368.
- Ryan, D.H., 2004. Clinical use of sibutramine. *Drugs Today* 40, 41–54.
- Sachdev, M., Miller, W.C., Ryan, T., Jolis, J.G., 2002. Effect of fenfluramine-derivative diet pills on cardiac valves: a meta-analysis of observational studies. *Am. Heart J.* 144, 1065–1073.
- Samanin, R., Garattini, S., 1993. Neurochemical mechanism of action of anorectic drugs. *Pharmacol. Toxicol.* 73, 63–68.
- Sanchis, D., Balada, F., Grasa, M.M., Virgili, J., Peinado, J., Monserrat, C., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 1990. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int. J. Obesity* 20, 588–594.
- Turner, P., 1990. Dexfenfluramine. Its place in weight control. *Drugs* 39, 53–62.
- van Gaal, L.F., Wauters, M.A., Peiffer, F.W., de Leeuw, I.H., 1998. Sibutramine and fat distribution: is there a role for pharmacotherapy in abdominal/visceral fat reduction? *Int. J. Obesity* 22 (suppl. 1), S38–S40.
- Voigt, J.P., Schade, R., Fink, H., Hörtnagl, H., 2002. Role of 5-HT1A receptors in the control of food intake in obese Zucker rats of different ages. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 403–409.
- Wellman, P.J., Maher, T.J., 1999. Synergistic interactions between fenfluramine and phentermine. *Int. J. Obesity* 23, 723–732.
- Zychlinski, L., Montgomery, M.R., 1984. Alterations in monoamine oxidase activity after single and repeated exposure of rats to chlorphentermine. *Toxicol. Lett.* 22, 133–138.

4. Combined effects of oleoyl-estrone and a β_3 -adrenergic agonist (CL316,243) on lipid stores of diet-induced overweight male Wistar rats

Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernández-López, Alemany M. *Life Sciences*, 77: 2051-2058, 2005.



Combined effects of oleoyl-estrone and a β_3 -adrenergic agonist (CL316,243) on lipid stores of diet-induced overweight male Wistar rats

Raquel Ferrer-Lorente, Cristina Cabot,
José-Antonio Fernández-López, Marià Alemany*

*Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Biology, University of Barcelona,
Av. Diagonal, 645, E-08028 Barcelona, Spain*

Received 17 November 2004; accepted 25 April 2005

Abstract

Oleoyl-estrone (OE) decreases appetite, induces adipose tissue wasting and resets the ponderostat setting, sparing glucose and protein. The β_3 -adrenergic agonists increase energy expenditure and lipolysis. We studied the combination of both treatments to enhance fat mobilization. Overweight male rats received oral OE for 10 days; they were compared with controls and rats receiving a β_3 -adrenergic agonist, CL316,243 (B3A); another group received both OE and B3A. Serum 3-hydroxybutyrate, NEFA, triacylglycerols and glucose showed only slight changes in all groups vs. controls; OE-treated rats showed lower cholesterol. OE decreased food intake and B3A increased energy expenditure. OE rats lost about 15%, B3A 24%, and those receiving both compounds lost 39% of their initial total body energy. In all cases, most of this energy imbalance was accounted for by the loss of body lipid. The combined treatment of OE and B3A reduced food intake, nevertheless maintaining a high energy expenditure. The combination of a β_3 -adrenergic agonist with OE may help compensate the short-lived effects of the agonist and enhance the lipid mobilization action of OE. The eventual combination of both compounds should be explored as a way to obtain faster and more effective ways to treat obesity.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Obesity; Oleoyl-estrone; CL316,243; β_3 -adrenergic agonists

* Corresponding author. Tel.: +34 934034606; fax: +34 934037064.

E-mail addresses: rferrer@bio.ub.es (R. Ferrer-Lorente), ccabot@bio.ub.es (C. Cabot), josfernandez@ub.edu (J.-A. Fernández-López), malemany@ub.edu (M. Alemany).

Introduction

Energy balance is maintained by compensating energy expenditure with energy intake; any alteration in that equilibrium affects body energy stores, mainly triacylglycerols. Most treatments of obesity and overweight rely either in decreasing energy intake or increasing energy expenditure, as a way to imbalance the energy equation and force the utilization of fat stores. This process is often hampered by neural and endocrine mechanisms that tend to restore the initial conditions. Oleoyl-estrone (OE) treatment has been found to alter the ponderostat setting (Adán et al., 1999) of rats, inducing the loss of body fat without concurring loss of protein and starvation-like changes in glucose handling (Sanchis et al., 1997), such as those encountered when food intake is reduced (Dietz and Wolfe, 1985). OE is known to decrease appetite (Sanchis et al., 1997; Adán et al., 1999), increase adipose tissue lipid mobilization (Grasa et al., 2001a) and maintain energy expenditure (Sanchis et al., 1996) or –at least– prevent the decrease that often parallels the decreases in energy intake (Shibata and Bukowiecki, 1987).

A number of specific β_3 -adrenergic agonists have been developed to stimulate brown adipose tissue thermogenesis (Lipworth, 1996). In general, these agonists increase energy expenditure (Himms-Hagen et al., 1994; Atgié et al., 1998), but their effects are shortly counteracted by glucocorticoids (Fève et al., 1992; Onai et al., 1995), reducing their long-term potential for the treatment of obesity (Fernández-López et al., 2002).

Since the metabolic effects of β_3 -adrenergic agonists (increasing energy expenditure and increasing lipolysis) are only partially overlapping (lipolysis) with those of OE (decreasing appetite, resetting the ponderostat, inducing adipose tissue wasting), we studied the possibility of their combined administration on energy balance, in order to magnify the decrease of fat stores.

Materials and methods

Male Wistar rats (Harlan-Interfauna, Sant Feliu de Codines, Spain) of 45 days were used. The rats were maintained at 21–22 °C, 60–50% relative humidity, and 12 h light/dark cycle (on from 08:00) in 3-rat cages and were fed for five weeks a reduced cafeteria diet (Balada et al., 1997) ad libitum. At the end of this phase, the animals were already overweight (i.e. their weight was at least 15% higher than the weight corresponding to animals of the same stock and age fed the standard pellet diet). The rats were reconditioned during an additional week with standard rat chow ad libitum (maintenance chow, Panlab, Barcelona, Spain) as sole food. They were used in the ensuing experiment at this point, when their age was 90 days, and they weighed 330–390 g.

The experimental setup and procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona. All animal handling procedures were carried out following the guidelines established by the EU, and the Spanish and Catalan Governments.

All animals received a daily gavage of 0.2 mL sunflower oil at the beginning of the light cycle and were maintained under standard housing conditions, with full access to water and food pellets; their weight and food consumption were recorded daily. Four groups of six animals were randomly selected: a) Controls; b) oleoyl-estrone: OE; c) β_3 -adrenergic agonist CL316,243 (B3A): B3; and d) oleoyl-estrone and β_3 -adrenergic agonist: OE–B3. Groups B3 and OE–B3 were implanted on day 0 subcutaneously in the back with an osmotic Alzet minipump (type 2002, Alzet, Palo Alto CA,

USA) under isoflurane anaesthesia; the minipumps were loaded with B3A (β_3 -adrenergic agonist CL316,243; Sigma, St Louis, MO, USA) dissolved in saline. The minipumps released B3A at a rate of 0.5 $\mu\text{L/h}$ in the subcutaneous space, at a dose of 1 mg/kg a day. The rats in the OE and OE–B3 groups received a gavage containing OE (OED, Barcelona, Spain) in oil, at a daily dose of 10 $\mu\text{mol/kg}$. The gavage of rats in the control and B3 groups contained only oil.

The treatments continued for 10 days. At the end of the experiment, the rats were killed by decapitation. Blood was let to clot; the serum was stored at -80°C until processed. The rats were dissected; the stomach and intestinal contents were removed; the remaining carcass (including the unused blood and packed blood cells) were sealed in polyethylene bags, autoclaved, and thoroughly homogenized (Grasa et al., 2001a). The rat paste was used for the estimation of lipid (Folch et al., 1957), and energy content using an adiabatic bomb calorimeter (C-7000 Ika, Heitersheim, Germany). Paste composition was related to in vivo weight correcting by digestive canal contents. The percentage body composition of controls was used to estimate the absolute lipid and energy content of the rats at the beginning of the experiment, by applying it to their known initial weights. The measured body weight and composition of the rats at the end of the study were used to determine the changes in body size and composition that occurred during the 10 days of treatment.

Energy intake was estimated from the food consumed that contained a metabolisable energy of 13.3 kJ/g. Energy accretion was the difference between estimated energy on day 0 and the measured energy content (bomb calorimeter) on day 10. Mean energy expenditure was estimated as the difference between energy intake and energy accretion.

Blood serum was used for the measurement of glucose (Trinder kit, Sigma, St Louis, MO, USA), non-esterified fatty acids (NEFA kit, Wako Chemicals, Neuss, Germany), 3-hydroxybutyrate (kit 907979, Roche, Mannheim, Germany), total triacylglycerols (kit 11 528, Biosystems, Barcelona, Spain), total cholesterol (Cholesterol reagent easy, Menarini, Firenze Italy), as well as insulin (SRI-13K, Linco, St Charles, MO, USA).

Insulin resistance was evaluated using the formulas for the homeostasis model assessment (i.e. the HOMA score) (Bonora et al., 2000; Matthews et al., 1985). This index has been found to be highly correlated in humans with insulin resistance assessed by the euglycemic hyperinsulinemic clamp technique and is widely used in clinical studies.

Table 1

Body weight and composition of rats treated with a β_3 -adrenergic agonist (CL316,243) and OE

| Parameter | Units | Control d 10 | OE d 10 | B3 d 10 | OE–B3 d 10 | OE | B3A |
|---------------------------|-------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------|--------|
| Initial body weight (d 0) | g | 367 \pm 14 | 356 \pm 10 | 346 \pm 14 | 351 \pm 12 | NS | NS |
| Final body weight (d 10) | g | 370 \pm 13 | 330 \pm 9 | 338 \pm 16 | 313 \pm 4 | 0.018 | NS |
| Body energy content | kJ/g | 11.73 \pm 0.49 | 10.63 \pm 0.07 | 8.95 \pm 0.46 | 7.86 \pm 0.30 | 0.010 | <0.001 |
| Final body energy | MJ | 4.35 \pm 0.29 | 3.51 \pm 0.08 | 3.51 \pm 0.12 | 2.47 \pm 0.12 | 0.016 | <0.001 |
| Body lipid | % BW | 17.2 \pm 1.1 | 15.3 \pm 0.7 | 9.9 \pm 1.3 | 7.1 \pm 0.6 | 0.025 | <0.001 |
| Final body lipid pool | g | 63.8 \pm 5.0 | 50.4 \pm 1.3 | 33.0 \pm 3.3 | 22.2 \pm 2.0 | 0.005 | <0.001 |
| Food intake | g/d | 16.6 \pm 1.3 | 11.6 \pm 0.6 | 16.2 \pm 1.0 | 11.5 \pm 0.3 | <0.001 | NS |

The data are the mean \pm SEM of six animals per group. Statistical differences between groups (two-way ANOVA): the columns show the *P* values for the significance of the effect of OE and B3A. In all cases, the *P* for interaction between both agents was not significant. NS=not significant (*P*>0.05).

Table 2

Energy balance of rats treated with a β_3 -adrenergic agonist (CL316,243) and OE

| Parameter | Units | Control d 10 | OE d 10 | B3 d 10 | OE-B3 d 10 |
|--|-------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Energy intake | W | 2.54 ± 0.20 | 1.78 ± 0.09 | 2.39 ± 0.18 | 1.76 ± 0.04 |
| Energy accretion | mW | 52 ± 174 | -771 ± 68 | -1212 ± 206 | -1919 ± 120 |
| Lipid contribution to energy accretion | % | 109 ± 36 | 68 ± 8 | 97 ± 7 | 88 ± 6 |
| Energy expenditure | W | 2.49 ± 0.28 | 2.55 ± 0.10 | 3.69 ± 0.19 | 3.68 ± 0.09 |

The data are the mean ± SEM of six animals per group. Statistical analysis of the differences (in experimental data only) between groups (two-way ANOVA): effect of OE: $P < 0.01$ for energy intake and energy accretion and effect of B3A: $P < 0.01$ for energy accretion. The P for interaction between both agents was not significant except for lipid contribution to energy accretion ($P = 0.002$).

Statistical comparisons between groups were established by two-way ANOVA.

Results

Table 1 shows the changes in body weight and composition and food intake of the four experimental groups. The rats receiving OE alone or combined with B3A decreased significantly their body weight when compared with controls, the maximal loss corresponding to the OE-B3 group, which lost c. 1% of body weight per day. The energy content and body lipid of the groups OE, B3 and OE-B3 were lower than those of controls. Controls increased their lipid content by only

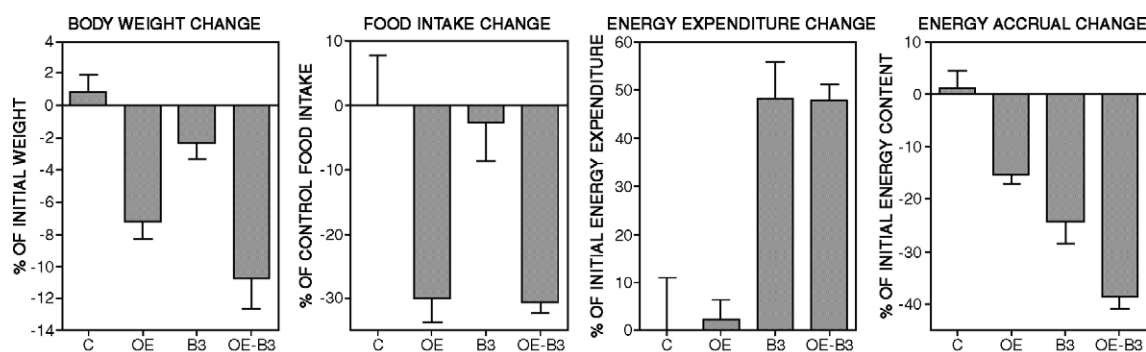


Fig. 1. Percent changes in body weight, food intake, energy expenditure and energy content of rats treated with a β_3 -adrenergic agonist (CL316,243) and OE. The data are the mean ± SEM of six animals per group. Statistical differences between groups (two-way ANOVA): the columns show the P values for the significance of the effect of OE and the β_3 -adrenergic agonist; in all cases, the P for interaction between both agents was not significant. NS=not significant ($P > 0.05$).

| | P values | |
|--------------------|----------|--------------------|
| | OE | β_3 -agonist |
| body weight | <0.001 | <0.023 |
| food intake | <0.001 | NS |
| energy expenditure | NS | <0.001 |
| energy accretion | <0.001 | <0.001 |

Table 3
Serum composition of rats treated with a β_3 -adrenergic agonist (CL316,243) and OE

| Parameter | Units | Control d 10 | OE d 10 | B3 d 10 | OE–B3 d 10 | OE | B3A |
|----------------------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|--------|
| Glucose | mM | 8.23 \pm 0.13 | 8.68 \pm 0.17 | 7.49 \pm 0.08 | 7.84 \pm 0.18 | 0.020 | <0.001 |
| Triacylglycerol | mM | 1.79 \pm 0.09 | 1.45 \pm 0.20 | 1.17 \pm 0.31 | 1.25 \pm 0.21 | NS | NS |
| 3-Hydroxybutyrate | μ M | 127 \pm 6 | 100 \pm 13 | 148 \pm 15 | 131 \pm 2 | NS | 0.034 |
| Non-esterified fatty acids | μ M | 420 \pm 33 | 449 \pm 47 | 350 \pm 11 | 371 \pm 36 | NS | NS |
| Total cholesterol | mM | 2.26 \pm 0.16 | 1.55 \pm 0.06 | 2.34 \pm 0.19 | 1.61 \pm 0.12 | <0.001 | NS |
| Insulin | pM | 561 \pm 60 | 384 \pm 49 | 290 \pm 50 | 327 \pm 28 | NS | 0.008 |
| HOMA score | | 28.6 \pm 3.1 | 20.8 \pm 2.9 | 13.4 \pm 2.3 | 15.9 \pm 1.5 | NS | 0.003 |

The data are the mean \pm SEM of six animals per group. Statistical differences between groups (two-way ANOVA): the columns show the *P* values for the significance of the effect of OE and B3A. In all cases, the *P* for interaction between both agents was not significant. NS=not significant (*P*>0.05).

0.6 \pm 5.5% of the initial lipid; the OE rats lost 17.5 \pm 0.8%, the loss of the B3 group was 44.1 \pm 4.3% and the combined OE–B3 lost 63.2 \pm 3.2%. The loss of lipid in the OE–B3 group was close to the sum of the lipid lost by the OE and B3 groups.

Food intake of the B3 group was similar to that of controls, however, both groups receiving OE decreased food intake by almost one-third.

Table 2 presents the energy balances of the four experimental groups. Energy expenditure was similar in the OE rats and controls but increased by 47–48% in the rats receiving B3A: B3 and OE–B3. Energy accretion was not different from 0 in the controls; in the OE group, the rats lost about 15% of their energy in 10 days, the B3 lost 24% and the OE–B3 lost 39% (Fig. 1). The lipid loss accounted for most of the negative energy accretion of the OE, B3 and OE–B3 groups and completely justified the small energy increase of controls.

Blood glucose slightly increased in OE rats but decreased in the B3 and B3-OE animals compared with controls (Table 3). B3A treatment induced a small increase in circulating ketone bodies, an effect not observed in OE-treated rats. In spite of the dramatic changes in lipid-energy content of the rats treated with OE and/or B3A, no significant changes were observed in triacylglycerol or non-esterified fatty acids. Cholesterol levels were unaffected by B3A, but in both groups receiving OE, cholesterol levels decreased significantly.

Insulin levels decreased in all treated animals, the decrease being maximal in the rats receiving B3A; similarly, insulin resistance decreased in all the treated groups according to the HOMA scores, the decrease being significant for the groups receiving B3A.

Discussion

The marked lipid mobilizing effects of OE and B3A were clearly observed in the OE and B3 groups, but in the OE–B3 group, the effects appeared to be additive. The combined treatment with OE and B3A reduced food intake and maintained a high level of energy expenditure; as a consequence, the loss of body energy was dramatic, more than one-third of all the body energy in just 10 days. The loss of energy was accounted for by the loss of body lipid. The effects on body weight were less marked since the loss of energy was limited to fat, which occupies only a limited space and packs little water in the adipose tissue.

The results presented indicate a fully additive effect of OE and the β_3 -adrenergic agonist. The increase of energy expenditure elicited by B3A (Yoshida et al., 1996) was maintained since OE does not significantly affect energy expenditure (Sanchis et al., 1996) and, contrarily to B3A (Lipworth, 1996), do not increase thermogenesis (Cabot et al., 2001). On the other side, most β_3 -adrenergic agonists do not affect food intake, but OE decreases the ingestion of food (Sanchis et al., 1996), in part by maintaining glycaemia through the sparing of glucose (Grasa et al., 2001a). Nevertheless, both OE and B3A induce the massive mobilization of lipid from adipose tissue (Atgié et al., 1997; Carpéné et al., 1998; Remesar et al., 2002). In the case of the β_3 -adrenergic agonists this mobilization, largely due to a direct stimulation of lipolysis (Atgié et al., 1997; Carpéné et al., 1998), supplies lipid to fuel thermogenesis (Himms-Hagen et al., 1994; Atgié et al., 1997). The β_3 -adrenergic agonists also enhance glucose disposal (de Souza et al., 1997), although lipid mobilization elicited by OE provides energy for the maintenance of metabolic activity and muscle function under limited energy availability (Blay et al., 2002), sparing glucose and protein (Sanchis et al., 1997). In addition, OE promotes adipocyte apoptosis (Remesar et al., 2002) and maintains energy and glucose homeostasis (Grasa et al., 2001a) increasing insulin sensitivity (Grasa et al., 2001b), processes that facilitate the selective disposal of stored fat. Blood glucose was lower in all groups receiving B3A, which hints at OE not being sufficiently effective in maintaining glycemia to compensate for the enhancement of glucose utilization elicited by the adrenergic agonist.

The rat model used here, mildly overweight adult males, is adequate for the study of fat mobilization in comparison with younger normal-weight rats since the accumulation of some fat during the cafeteria diet period allows for a more potent and continued loss of fat and also because their increased insulin resistance makes them closer to the condition of overweight humans (Carey et al., 1996).

The effects of OE were practically superimposed to those of B3A, as can be ascertained by changes in the insulin resistance HOMA score. OE continued exerting its homeostatic maintenance of energy and glucose availability even under the strain of a pharmacologically elicited increase in energy expenditure.

The results presented suggest that the combination of a β_3 -adrenergic agonist with OE may help compensate for the usually short-lived effects of the agonist and enhance the lipid mobilization action of OE. The eventual combination of both compounds should be explored as a way to obtain faster and more effective ways to treat obesity.

Acknowledgements

Funding by grants 01/1300 and 01/1309 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias from the Government of Spain (including FEDER funds from the European Union) is gratefully acknowledged.

References

- Adán, C., Cabot, C., Esteve, M., Grasa, M.M., Massanés, R., Vilà, R., Estruch, J., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 1999. Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *International Journal of Obesity* 22, 366–373.
- Atgié, C., d'Allaire, F., Bukowiecki, L.J., 1997. Role of β_1 - and β_3 -adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. *American Journal of Physiology* 273, C1136–C1142.

- Atgié, C., Faintrenie, G., Carpéné, C., Bukowiecki, L.J., Géloën, A., 1998. Effects of chronic treatment with noradrenaline or a specific β_3 -adrenergic agonist, CL 316,243, on energy expenditure and epididymal adipocyte lipolytic activity in rat. *Comparative Biochemistry and Physiology. A* 119A, 629–636.
- Balada, F., Sanchis, D., Virgili, J., Grasa, M.M., Monserrat, C., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 1997. Effect of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) on the body weight of rats fed a cafeteria diet. *Archives of Physiology and Biochemistry* 105, 487–495.
- Blay, M., Peinado-Onsurbe, J., Grasa, M.M., Díaz-Silva, M., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2002. Effect of oral oleoyl-estrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase and lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *International Journal of Obesity* 26, 618–626.
- Bonora, E., Saggiani, F., Targher, G., Zenere, M.B., Alberiche, M., Monauni, T., Bonadonna, R.C., Muggeo, M., 2000. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. Studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23, 57–63.
- Cabot, C., Grasa, M.M., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2001. Effect of oleoyl-estrone treatment on the expression β_1 - β_2 - and β_3 -adrenoreceptors in rat adipose tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry* 221, 109–115.
- Carey, D.G., Jenkins, A.B., Campbell, L.V., Freund, J., Chisholm, D.J., 1996. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women. Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes* 45, 633–638.
- Carpéné, C., Bousquet-Mélou, A., Galitzky, J., Berlan, M., Lafontan, M., 1998. Lipolytic effects of β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 839, 186–189.
- de Souza, C.J., Hirshman, M.F., Horton, E.S., 1997. CL-316,243, a β_3 -specific adrenoceptor agonist, enhances insulin-stimulated glucose disposal in nonobese rats. *Diabetes* 46, 1257–1263.
- Dietz, W.H., Wolfe, R.R., 1985. Interrelationships of glucose and protein-metabolism in obese adolescents during short-term hypocaloric dietary therapy. *American Journal of Clinical Nutrition* 42, 380–390.
- Fernández-López, J.A., Remesar, X., Foz, M., Alemany, M., 2002. Pharmacological approaches for the treatment of obesity. *Drugs* 62, 915–944.
- Fève, B., Baude, B., Krief, S., Strosberg, A.D., Pairault, J., Emorine, L.J., 1992. Inhibition by dexamethasone of β_3 -adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442A adipocytes: evidence for a transcriptional mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 267, 15909–15915.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 232, 497–509.
- Grasa, M.M., Cabot, C., Esteve, M., Yubero, P., Massanés, R.M., Blay, M., Vilà, R., López-Martí, J., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2001a. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obesity Research* 9, 202–209.
- Grasa, M.M., Esteve, M., Massanés, R.M., Yubero, P., Blay, M., López-Martí, J., Cabot, C., Vilà, R., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 2001b. Oral gavage of oleoyl-estrone has a stronger effect on body weight in male obese Zucker rats than in female. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 3, 203–208.
- Himms-Hagen, J., Cui, J.Y., Danforth, E., Taatjes, D.J., Lang, S.S., Waters, B.L., Claus, T.H., 1994. Effect of CL-316,243, a thermogenic β_3 -agonist, on energy-balance and brown and white adipose tissues in rats. *American Journal of Physiology* 266, R1371–R1382.
- Lipworth, B.J., 1996. Clinical pharmacology of β_3 -adrenoceptors. *British Journal of Clinical Pharmacology* 42, 291–300.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Teacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 28, 412–419.
- Onai, T., Kilroy, G., York, D.A., Bray, G.A., 1995. Regulation of β_3 -adrenergic receptor mRNA by sympathetic nerves and glucocorticoids in BAT of Zucker obese rats. *American Journal of Physiology* 269, R519–R526.
- Remesar, X., Fernández-López, J.A., Blay, M.T., Savall, P., Salas, A., Díaz-Silva, M., Esteve, M., Grasa, M.M., Alemany, M., 2002. Effect of oral oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *International Journal of Obesity* 26, 1092–1102.
- Sanchis, D., Balada, F., Grasa, M.M., Virgili, J., Peinado, J., Monserrat, C., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 1996. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *International Journal of Obesity* 20, 588–594.

- Sanchis, D., Balada, F., Picó, C., Grasa, M.M., Virgili, J., Farrerons, C., Palou, A., Fernández-López, J.A., Remesar, X., Alemany, M., 1997. Rats receiving the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Archives of Physiology and Biochemistry* 105, 663–672.
- Shibata, H., Bukowiecki, L.J., 1987. Regulatory alterations of daily energy expenditure induced by fasting or overfeeding in unrestrained rats. *Journal of Applied Physiology* 63, 465–470.
- Yoshida, T., Umekawa, T., Sakane, N., Yoshimoto, K., Kondo, M., 1996. Effect of CL316,243, a highly specific β_3 -adrenoceptor agonist, on sympathetic nervous system activity in mice. *Metabolism* 45, 787–791.

5. Effects of combined oleoyl-estrone and rimonabant on overweight rats

Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernández-López, Alemany M. *Journal of Pharmacological Sciences*,

104: 176-182, 2007.

Full Paper

Effects of Combined Oleoyl-Estrone and Rimonabant on Overweight Rats

Raquel Ferrer-Lorente¹, Cristina Cabot¹, José-Antonio Fernández-López¹, and Marià Alemany^{1,*}¹Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain

Received November 17, 2006; Accepted April 24, 2007

Abstract. Oleoyl-estrone (OE) decreases appetite, maintains energy expenditure, induces lipolysis (sparing protein), and decreases cholesterolemia and insulin resistance. Rimonabant (SR141716) is a cannabinoid-receptor inhibitor that decreases appetite and mobilizes fat. We studied whether their combination improves their slimming effects. Male overweight rats received daily gavages of 5.3 mg/kg OE, 10 mg/kg rimonabant, or both drugs during 10 days. Body weight and composition, energy balance, adipose tissue weight, and serum hormones and metabolites were measured. OE halved food intake and maintained energy expenditure at the expense of body fat. Rimonabant effects on appetite and energy balance were less marked, resulting in lower lipid mobilization. OE and rimonabant followed the OE pattern, with no additive or synergic effects. Glycemia was maintained, but OE decreased insulin, GLP-1, and cholesterol, whilst rimonabant increased cholecystokinin and cholesterol, and decreased NEFA. Both drugs decreased leptin and triacylglycerols; ghrelin was unchanged. The results hint at different mechanisms of action of both drugs: we can assume that OE effects do not involve the cannabinoid pathway. OE does not seem to act, either, after 10 days, through the secretion of ghrelin or the intestinal appetite-controlling peptides tested.

Keywords: oleoyl-estrone, rimonabant, obesity, energy balance, adipose tissue

Introduction

Oleoyl-estrone (OE) is a natural hormone secreted by adipose tissue and carried by plasma lipoproteins (1). Oral administration of OE results in a marked loss of body weight in rats (2) and humans (3), characterized by a dose-dependent loss of body fat and the sparing of protein (4); this is achieved essentially by decreasing food intake and maintaining energy expenditure (5). The powerful lipolytic effect of OE occurs in parallel to a decrease in overall glucose utilization (6), maintenance of glycemia and liver glycogen (7), and decrease of circulating insulin (and insulin resistance) and leptin (6–8). OE does not need the concurrence of dietary restrictions to induce the loss of body weight (9).

Rimonabant (SR141716), an inhibitor of the CB1 cannabinoid receptor (10), has been found to markedly decrease appetite, both in rats (11) and humans (12).

Treatment with rimonabant improves the handling of glucose (13) and decreases cardiovascular risk (14, 15), by improving lipemia (16, 17).

Both drugs share a marked effect on appetite, which results in the loss of body fat, and improve cardiovascular risk by decreasing the levels of circulating lipids. The combination of drugs for the treatment of obesity has been a widely extended practice in the past, in part because of the slow pace of weight loss and the usually limited overall effect, in spite of insufficient prior testing, with dramatically deleterious effects in some cases (18–20). OE has been found to produce in rats a synergic boosting of body fat loss both with a β_3 -adrenergic agent (21) and a serotonergic drug, sibutramine (22), indicating that its mechanism of action was complementary of both thermogenesis and inhibition of appetite by enhancement of postsynaptic serotonin activity. Combination of OE and dietary restriction, however, showed no improvement over the administration of OE alone in the handling of body fat, but OE markedly improved the body metabolic and hormonal environment when compared with restricted

*Corresponding author. malemany@ub.edu
Published online in J-STAGE: June 8, 2007
doi: 10.1254/jphs.FP0061441

diet alone (9).

This study was performed to determine whether the combination of OE and rimonabant may result in synergistic effects on body weight. In addition, the combination of both agents may help us determine whether OE actions in the control of appetite occur along the same path as rimonabant.

Materials and Methods

Male Wistar rats (Harlan-Interfauna, Sant Feliu de Codines, Spain), 45 days of age, were used. Rats were maintained under standard housing conditions in two-rat cages, and they were fed for five weeks a reduced cafeteria diet (21, 22) ad libitum. At the end of this phase, the animals were already overweight, that is, weighed 26% more than the same-age controls. This protocol resulted in the accumulation of 17% fat, compared with the normal 9%–11% fat content of a male rat this age and strain; the difference can be comparable to that of overweight versus normal-weight humans. The rats were re-conditioned during an additional week with standard rat chow ad libitum (maintenance chow; Panlab, Barcelona, Spain) as the sole food. They were used in the ensuing experiment at this point, when their age was 90 days, and they weighed 330–390 g.

The experimental setup and procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona. All animal handling procedures were carried out following the guidelines established by the EU and the Spanish and Catalan Governments.

All animals were maintained under standard conditions with full access to food pellets; their weights and food consumption were recorded daily. Five groups of six animals were randomly selected: a) zero-time controls, b) controls, c) oleoyl-estrone [OE], d) rimonabant [RI], and e) rimonabant and oleoyl-estrone [RI-OE]. The rats in group a were killed and processed in order to obtain the proportions of body components at time zero. The remaining four groups received a daily gavage of 0.2 mL sunflower oil at the beginning of the light cycle. The gavage of rats in the control group contained only oil; rats in the OE and RI-OE groups gavage contained oleoyl-estrone (OED; Barcelona, Spain) at a daily dose of 10 μ mol/kg (i.e. 5.34 mg/kg). In groups RI and RI-OE, the oil gavage also contained rimonabant (Pharma Chem Lansheng Corp., Shanghai, China) at a daily dose of 10 mg/kg.

The treatments continued for 10 days. At the end of the experiment, the rats were killed by decapitation. Blood was collected in dry beakers and allowed to clot. The serum was stored at -80°C until processed. The rats

were dissected, and the stomach and intestinal contents were removed; the carcass and organs (including the unused blood and packed blood cells) were sealed in polyethylene bags, autoclaved, and thoroughly homogenized (4). The rat paste was used for the estimation of lipid (23) and energy content, using a bomb calorimeter (C-7000 Ika; Heitersheim, Germany). Paste composition was related to in vivo weight corrected by digestive canal contents. The absolute lipid and energy content of the rats at the beginning of the experiment was estimated by applying, to their known initial weights, the percentage body composition of the zero controls. The measured body weight and composition of the rats at the end of the study were used to determine the changes in body size and composition that occurred during the 10 days of treatment.

Energy intake was estimated from the food consumed, which contained a metabolizable energy of 13.3 kJ/g. Energy accrual was the difference between estimated energy on day 0 and the measured energy content (bomb calorimeter) on day 10. Mean energy expenditure was estimated as the difference between energy intake and net energy accrual.

Blood serum was used for the measurement of glucose (kit glucose PAP CP; Horiba ABX, Montpellier, France), non-esterified fatty acids (NEFA kit; Wako Chemicals, Neuss, Germany), 3-hydroxybutyrate (kit 907979; Roche, Mannheim, Germany), total triacylglycerols (kit 11528; Biosystems, Barcelona, Spain), total cholesterol (Cholesterol reagent easy; Menarini, Firenze, Italy), insulin (SRI-13K; Linco, St. Charles, MO, USA), ghrelin (kit RK-031031; Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Germany), cholecystokinin (kit RB-302; Euro-Diagnostics, Malmö, Sweden), and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (kit GLPIT-36HT, Linco).

Statistical comparisons between groups were established by two-way ANOVAs.

Results

Figure 1 shows the changes in body weight of overweight male rats treated with OE and rimonabant. OE induced a marked progressive loss of body weight, up to $13.8 \pm 2.4\%$ on day 10. Rimonabant rapidly decreased body weight on day 1, but practically went no further after the first days; on day 10, the overall loss of body weight was only $1.7 \pm 0.4\%$. Combination of OE and rimonabant, resulted in intermediate effects between both extremes.

Food intake is presented in Fig. 2. OE reduced overall food intake by 55% in the 10-day period, whilst rimonabant decreased it only 23%; the combination of both compounds resulted in a 57% reduction. The patterns,

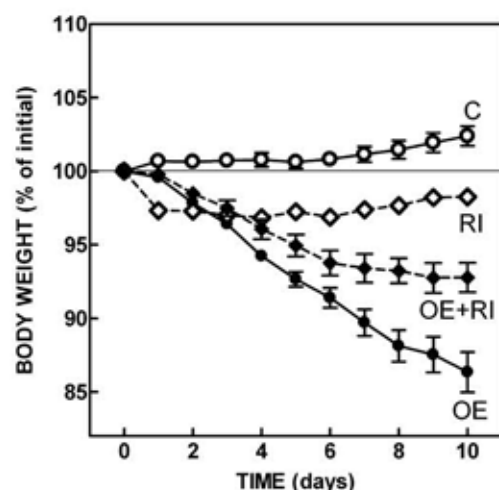


Fig. 1. Body weight change of overweight male Wistar rats receiving a daily oral dose of oleoyl-estrone and/or rimonabant. The data are the mean \pm S.E.M. of six different animals and are expressed as percent of the initial body weight. Statistical significance of the differences between groups on day 10 (ANOVA): effect of oleoyl-estrone: $P = 0.0000$; effect of rimonabant: $P = 0.6415$

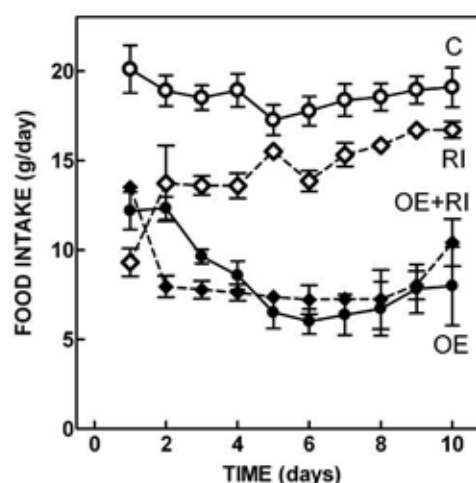


Fig. 2. Food intake of overweight male Wistar rats receiving a daily oral dose of oleoyl-estrone and/or rimonabant. The data are the mean \pm S.E.M. of six different animals. The statistical significance of the differences between groups with respect to the mean energy intake values for the whole period is presented in Fig. 3.

however, were widely different, with OE effects being maximal on days 5–7 forming a U-shaped curve, whilst rimonabant induced its maximal effects on food intake on day 1, and the gap between rimonabant and control rats progressively decreased thereafter. Combination of

OE and rimonabant were, again, intermediate between both patterns, but nevertheless closer to that of the OE-treated rats.

Table 1 shows the body composition of treated rats on day 10 compared with zero-time controls. Only OE

Table 1. Body composition on day 10 and food intake of rats treated with oleoyl-estrone and/or rimonabant

| Parameter | Units | Gavage | Controls | Rimonabant | P OE | P RI |
|---------------------|----------------------|--------|-----------------|-----------------|---------|---------|
| Body energy content | kJ/g | –OE | 11.6 \pm 0.6 | 10.8 \pm 0.3 | 0.0003* | 0.3917 |
| | | +OE | 8.8 \pm 0.1 | 8.6 \pm 0.6 | | |
| Body energy | MJ | –OE | 4.52 \pm 0.38 | 3.99 \pm 0.14 | 0.0004* | 0.4227 |
| | | +OE | 2.79 \pm 0.15 | 2.78 \pm 0.32 | | |
| Body lipid | % BW | –OE | 19.6 \pm 1.8 | 16.0 \pm 1.6 | 0.0001* | 0.2055 |
| | | +OE | 10.4 \pm 0.2 | 10.1 \pm 1.6 | | |
| Body lipid pool | g | –OE | 77.2 \pm 10.0 | 59.0 \pm 2.3 | 0.0003* | 0.2506 |
| | | +OE | 33.0 \pm 1.6 | 33.1 \pm 6.8 | | |
| Body protein | % BW | –OE | 16.8 \pm 0.4 | 16.7 \pm 0.3 | 0.0005* | 0.2711 |
| | | +OE | 18.8 \pm 0.5 | 18.0 \pm 0.3 | | |
| Body protein pool | g | –OE | 65.0 \pm 1.9 | 58.7 \pm 1.1 | 0.2461 | 0.0267* |
| | | +OE | 61.3 \pm 2.4 | 57.3 \pm 2.8 | | |
| Body lipid change | % of initial lipid | –OE | 16.6 \pm 10.2 | –8.7 \pm 3.6 | 0.0000* | 0.1569 |
| | | +OE | –47.7 \pm 2.5 | –47.5 \pm 8.4 | | |
| Body protein change | % of initial protein | –OE | 1.1 \pm 2.8 | –3.5 \pm 2.2 | 0.1827 | 0.3126 |
| | | +OE | –4.5 \pm 4.6 | –6.1 \pm 1.2 | | |

The data are the mean \pm S.E.M. of six animals per group. BW, body weight; \pm OE, plus/minus oleoyl-estrone in the gavage. Significance of the differences between groups (ANOVA): P values for the overall effects of OE (P OE) and rimonabant (P RI). *Statistically significance. There were no significant interactions between the different treatments (ANOVA).

Table 2. Liver and adipose tissue weights of rats treated with oleoyl-estrone and/or rimonabant

| Organ/tissue | Gavage | Controls | Rimonabant | <i>P</i> OE | <i>P</i> RI |
|---------------------|--------|---------------|---------------|-------------|-------------|
| Liver | -OE | 11.60 ± 0.53 | 11.81 ± 0.56 | 0.0435* | 0.2310 |
| | +OE | 9.86 ± 0.59 | 11.07 ± 0.61 | | |
| Interscapular BAT | -OE | 0.686 ± 0.059 | 0.808 ± 0.282 | 0.1195 | 0.6642 |
| | +OE | 0.507 ± 0.049 | 0.512 ± 0.038 | | |
| Subcutaneous WAT | -OE | 4.30 ± 0.28 | 3.92 ± 0.63 | 0.0220* | 0.1559 |
| | +OE | 3.49 ± 0.31 | 2.59 ± 0.42 | | |
| Epididymal WAT | -OE | 11.04 ± 2.20 | 8.85 ± 1.23 | 0.0762 | 0.1104 |
| | +OE | 8.19 ± 0.52 | 5.78 ± 1.11 | | |
| Retroperitoneal WAT | -OE | 11.81 ± 1.64 | 9.89 ± 1.39 | 0.0092* | 0.1220 |
| | +OE | 8.19 ± 0.69 | 5.79 ± 1.44 | | |
| Mesenteric WAT | -OE | 2.65 ± 0.28 | 2.32 ± 0.26 | 0.0631 | 0.236 |
| | +OE | 2.46 ± 0.22 | 1.48 ± 0.29 | | |

The data are the mean ± S.E.M. of six animals per group, and are expressed in g. BAT, brown adipose tissue; WAT, white adipose tissue; ±OE, plus/minus oleoyl-estrone in the gavage. Significance of the differences between groups (ANOVA): *P* values for the overall effects of OE (*P* OE) and rimonabant (*P* RI). *Statistically significance. There were no significant interactions between the different treatments (ANOVA).

reduced significantly body energy density and lipid content. Body energy increased $7.9 \pm 4.9\%$ in controls and decreased $30.8 \pm 4.1\%$ in OE, $3.3 \pm 3.0\%$ in rimonabant, and $30.0 \pm 5.4\%$ in OE combined with rimonabant. This loss was due essentially to a decrease in body lipids, which were practically halved in all OE-treated rats and decreased by 8.7% in those receiving only rimonabant. The loss of protein was only different from zero in the combined OE and rimonabant group, which lost 6.1%.

The loss of energy was centered essentially on adipose tissue. Table 2 presents the wet weights of liver and a number of adipose tissue sites. OE induced a 15% decrease in liver weight, but there were no significant changes in the other groups. Interscapular brown adipose tissue (BAT) mass tended to decrease with OE, and to increase with rimonabant, but the changes were not statistically significant. OE decreased the mass of white adipose tissue (WAT) in all sites, but data on mesenteric and epididymal WAT were not statistically significant. Rimonabant effects were similar, but much less marked. The combination of OE and rimonabant induced more marked decreases in all WAT sites.

Figure 3 shows the energy balance of the four groups of rats studied. Neither OE nor rimonabant or their combination affected energy expenditure. However, energy storage changed drastically from accrual of $20 \pm 12\%$ of energy intake in control rats to providing $53 \pm 6\%$, $7 \pm 5\%$, and $52 \pm 6\%$ of energy expenditure, respectively, for OE, rimonabant, and their combination, with the corresponding decreases in energy intake.

Table 3 presents the serum composition of controls

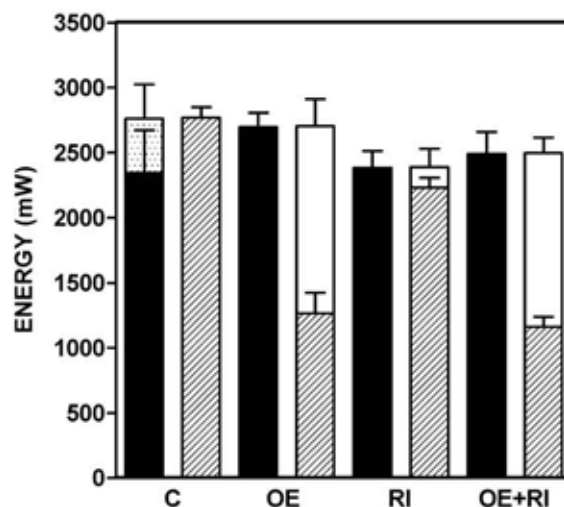


Fig. 3. Energy balance of overweight male Wistar rats receiving a daily oral dose of oleoyl-estrone and/or rimonabant. Each experimental group is represented by two columns; the columns on the left represent the fate of the energy available (dotted = net energy stored and black = energy expenditure), and those on the right represent the source of that energy (white = net internal stores contribution and dashed = energy intake). All data were measured/calculated from six animals per group and are shown with the corresponding S.E.M. C = controls, RI = rimonabant, OE = oleoyl-estrone, OE + RI = combined OE and rimonabant. Statistical significance of the differences between groups (ANOVA): energy expenditure: effect of oleoyl-estrone: *P* = 0.1520, effect of rimonabant: *P* = 0.9407; energy intake: effect of oleoyl-estrone: *P* = 0.0000, effect of rimonabant: *P* = 0.0164; energy accrual: effect of oleoyl-estrone: *P* = 0.0238, effect of rimonabant: *P* = 0.3348. There were no statistically significant interactions between both treatments.

Table 3. Serum composition of rats treated with oleoyl-estrone and/or rimonabant

| Parameter | Units | Gavage | Controls | Rimonabant | <i>P</i> OE | <i>P</i> RI |
|----------------------------|-------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Glucose | mM | -OE | 7.70 ± 0.17 | 7.74 ± 0.39 | 0.5048 | 0.1573 |
| | | +OE | 7.17 ± 0.26 | 7.91 ± 0.27 | | |
| Triacylglycerol | mM | -OE | 2.01 ± 0.09 | 1.16 ± 0.11 | 0.0108* | 0.1034 |
| | | +OE | 1.01 ± 0.18 | 1.37 ± 0.12 | | |
| Total cholesterol | mM | -OE | 1.70 ± 0.09 | 2.29 ± 0.10 | 0.0000* | 0.0023* |
| | | +OE | 0.92 ± 0.08 | 0.97 ± 0.08 | | |
| Non-esterified fatty acids | μM | -OE | 496 ± 58 | 369 ± 76 | 0.4205 | 0.0483* |
| | | +OE | 482 ± 85 | 233 ± 113 | | |
| Insulin | pM | -OE | 536 ± 72 | 585 ± 132 | 0.0002* | 0.6955 |
| | | +OE | 319 ± 67 | 342 ± 77 | | |
| Leptin | pM | -OE | 689 ± 63 | 535 ± 75 | 0.0000* | 0.0239* |
| | | +OE | 339 ± 52 | 190 ± 56 | | |
| Cholecystokinin | pM | -OE | 1.37 ± 0.25 | 1.95 ± 0.27 | 0.1611 | 0.0445* |
| | | +OE | 1.10 ± 0.30 | 1.53 ± 0.13 | | |
| Ghrelin | pM | -OE | 491 ± 54 | 607 ± 130 | 0.1016 | 0.4158 |
| | | +OE | 422 ± 43 | 427 ± 86 | | |
| GLP-1 | pM | -OE | 50.5 ± 10.8 | 58.3 ± 8.4 | 0.0041* | 0.7939 |
| | | +OE | 30.0 ± 5.9 | 26.4 ± 4.3 | | |

The data are the mean ± S.E.M. of six animals per group. ±OE, plus/minus oleoyl-estrone in the gavage. Significance of the differences between groups (ANOVA): *P* values for the overall effects of OE (*P* OE) and rimonabant (*P* RI). *Statistically significance. There were significant interactions (ANOVA) between the treatments with OE and rimonabant only for triacylglycerols (*P* = 0.0031) and total cholesterol (*P* = 0.0085).

and rats treated with OE and rimonabant. There were no significant changes in glucose, in spite of a decrease in insulin in all OE groups. Non-esterified fatty acid levels did not change with respect to controls with OE, but rimonabant reduced their concentration. Triacylglycerol levels decreased in a similar way in all treated groups compared with controls. Cholesterol was markedly decreased by OE alone or in combination with rimonabant; the latter drug alone, however, increased cholesterol levels compared with controls.

Leptin levels were reduced by rimonabant, but the decrease was more marked in OE-treated rats; in this case, the combination of both drugs resulted in a leptin level that was only 28% of the control value. Cholecystokinin levels were higher in rimonabant-treated rats and decreased with OE, but the differences of OE versus controls were not significant. Either OE or rimonabant did not change the levels of ghrelin. GLP-1 was unchanged by rimonabant alone, but OE, alone or combined, practically halved its levels.

Discussion

OE effects on weight, energy, lipid, and protein were similar to the previously reported ones (4, 9, 21, 22). Rimonabant effects and its rapid effect on appetite agree with previous studies (11). The effects of rimonabant on body fat content and on the distribution of fat in WAT sites were small, especially compared with OE.

The effects of the combination of OE and rimonabant on appetite were close to those of OE alone, body weight loss was: OE > OE + rimonabant > rimonabant; and fat loss in WAT was higher for the combination than for either drug alone. OE + rimonabant resulted in higher weight losses in WAT sites, but the overall body loss of lipids was similar to that of OE alone, which hints at the drug combination probably inducing the loss of fat in extra-WAT sites (such as muscle and liver). The higher weight loss of OE alone vs OE + rimonabant could not be simply justified by the loss of lipid or protein, and points to rimonabant inducing a higher retention of body water, in spite of cannabinoid receptor antagonists decreasing water intake along with diminished appetite (24).

The lack of additive effects suggests that there are no grounds for their simultaneous administration: no synergistic effect was found in the combination for the purposes of shedding fat.

OE decreased circulating triacylglycerols and cholesterol in a similar proportion, but rimonabant tended to increase cholesterol whilst decreasing triacylglycerols, which suggest that OE (25, 26) and rimonabant (16, 17) are not coincident in the pathway to improve lipidemia, especially when OE levels of lipid went down under a massive peripheral lipolysis (4, 27). These results partly contrast with the known effect of rimonabant increasing the HDL-cholesterol fraction and decreasing triacylglycerolemia in humans (28, 29); the difference with the present situation is probably a consequence of the different serum lipid handling by humans and rats. The improvement of insulin resistance was again more marked in OE-treated animals (6, 8, 30), which maintained glucose levels and decreased circulating insulin.

The analysis of serum appetite-controlling peptides is not consistent in the case of OE with the observed decrease in appetite. Ghrelin has a powerful effect on hunger (31), thus increasing food intake (32). OE or rimonabant did not change circulating ghrelin in spite of decreased food intake. GLP-1 tends to decrease appetite (33), but this signal is also reduced in the rats receiving OE. Cholecystokinin enhances satiety by decreasing gastric emptying (34), a trait in part shared with OE (R. Ferrer-Lorente et al., unpublished results). Cholecystokinin is a well-known candidate for the pharmacological decrease of appetite (35) and has been found to act synergically with leptin in decreasing food intake (36, 37). Rimonabant increased the levels of cholecystokinin, which was unaffected by OE.

The data on peptides suggests that OE does not act on appetite through inhibition of ghrelin secretion or enhancing the secretion of intestinal peptides that induce satiety or block food intake.

There was an additive effect of OE and rimonabant on leptin, both inducing decreases in leptin levels. Rimonabant decreases leptin, and endocannabinoids are controlled by leptin (38). OE inhibits leptin synthesis and decreases its levels (7). The mechanism for this action is unclear, but in the case of OE, it seems to go beyond the decrease in WAT mass that obviously reduces the main site of leptin production (39). The additive effects of rimonabant and OE are not directly related to the mass of adipose tissue and are probably the cause of different regulation paths acting on the secretion of leptin.

Leptin regulated the hypothalamic secretion of neuropeptide Y and proopiomelanocortins, controlling appetite (40, 41), and its marked decrease may favor the

action of orexigenic mechanisms. The low levels found here and the strongly inhibited food intake (at least in the OE-treated animals) do not agree with this function. OE has been found, however, to act on body fat and appetite downstream of leptin, since OE acts even on rats with compromised integrity in their leptinergic pathways (40).

The lack of additive effects of OE and rimonabant on appetite and lipolytic activity, together with the different handling of lipids and intestinal peptides hint at different mechanisms of action of both drugs. Since rimonabant's mechanism of action is well known, blocking the CBI cannabinoid receptors (10), we can assume that OE does not act through this cannabinoid pathway. OE does not seem to act, either, in the long term, through the control of ghrelin or intestine appetite-controlling peptides.

Acknowledgments

Material and financial help from OED SL (Barcelona, Spain) is gratefully acknowledged. This work was in part supported by grants of the "Fondo de Investigaciones Sanitarias" and of the "Plan Nacional de Investigación en Biología Fundamental", both from the Government of Spain.

References

- 1 Virgili J, Casals I, Peinado-Onsurbe J, Esteve M, Julve J, Fernández-López JA, et al. Distribution of oleoyl-estrone in rat plasma lipoproteins. *Horm Metabol Res.* 1999;31:597-601.
- 2 Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Monserrat C, et al. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obesity.* 1996;20:588-594.
- 3 Alemany M, Fernández-López JA, Petrobelli A, Granada M, Foz M, Remesar X. [Weight loss in a patient with morbid obesity under treatment with oleoyl-estrone.] *Med Clin (Barc).* 2003;121:496-499. (text in Spanish with English abstract)
- 4 Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay M, et al. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res.* 2001;9:202-209.
- 5 Sanchis D, Balada F, Picó C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, et al. Rats receiving the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes Merlin-2; decrease food intake but maintain thermogenesis. *Arch Physiol Biochem.* 1997;105:663-672.
- 6 Grasa MM, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone decreases rat plasma insulin, leptin and adiponectin, lowering muscle and BAT glucose uptake. *Int J Obesity.* 2003;27 Suppl 1:S43 (abstract).
- 7 Sanchis D, Adán C, Ardévol A, Grasa MM, Cabot C, Balada F, et al. Short-term treatment with oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) strongly reduces the expression of the ob gene in young rats. *Biochem J.* 1997;326:357-360.
- 8 Díaz-Silva M, Grasa MM, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone on the energy balance of diabetic rats. *Horm Metabol Res.* 2003;35:

- 471–478.
- 9 Romero MM, Esteve M, Alemany M. Combined effects of oral oleoyl-estrone and limited food intake on body composition of young overweight male rats. *Int J Obesity*. 2006;30:1149–1156.
 - 10 Boyd ST, Fremming BA. Rimonabant – A selective CB1 antagonist. *Ann Pharmacother*. 2005;39:684–690.
 - 11 McLaughlin PJ, Winston K, Swezey L, Wisniecki A, Aberman J, Tardiff DJ, et al. The cannabinoid CB1 antagonists SR 141716A and AM 251 suppress food intake and food-reinforced behavior in a variety of tasks in rats. *Behav Pharmacol*. 2003;14:583–588.
 - 12 Gadde KM. Endocannabinoid receptor antagonists and other emerging pharmacological strategies for weight reduction. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5:549–556.
 - 13 Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice. *Int J Obesity*. 2005;29:183–187.
 - 14 Pi-Sunyer F, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients. RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006;295:761–775.
 - 15 Tonstad S. Rimonabant: a cannabinoid receptor blocker for the treatment of metabolic and cardiovascular risk factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16:156–162.
 - 16 Després JP, Golay A, Sjöström L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*. 2005;353:2121–2134.
 - 17 Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, et al. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabet Obes Metab*. 2005;7:65–72.
 - 18 Sachdev M, Miller WC, Ryan T, Jolis JG. Effect of fenfluramine-derivative diet pills on cardiac valves: a meta-analysis of observational studies. *Am Heart J*. 2002;144:1065–1073.
 - 19 Rich S, Shillington A, McLaughlin V. Comparison of survival in patients with pulmonary hypertension associated with fenfluramine to patients with primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*. 2003;92:1366–1368.
 - 20 Wellman PJ, Maher TJ. Synergistic interactions between fenfluramine and phentermine. *Int J Obesity*. 1999;23:723–732.
 - 21 Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Combined effects of oleoyl-estrone and a β_1 -adrenergic agonist (CL316,243) on lipid stores of diet-induced overweight male Wistar rats. *Life Sci*. 2005;77:2051–2058.
 - 22 Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effects of oleoyl-estrone with dexfenfluramine, sibutramine or phentermine on overweight rats. *Eur J Pharmacol*. 2005;513:243–248.
 - 23 Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;232:497–509.
 - 24 Gardner A, Mallet PE. Suppression of feeding, drinking, and locomotion by a putative cannabinoid receptor 'silent antagonist'. *Eur J Pharmacol*. 2006;530:103–106.
 - 25 Blay M, Peinado-Onsurbe J, Grasa MM, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X, et al. Effect of oral oleoyl-estrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase and lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *Int J Obesity*. 2002;26:618–626.
 - 26 Cabot C, Salas A, Ferrer-Lorente R, Savall P, Remesar X, Fernández-López JA, et al. Short-term oral oleoyl-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *Int J Obesity*. 2005;29:534–539.
 - 27 Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, et al. Effect of oral oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obesity*. 2002;26:1092–1102.
 - 28 Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, et al. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabet Obes Metab*. 2005;7:65–72.
 - 29 van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*. 2005;365:1389–1397.
 - 30 Díaz M, Grasa MM, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Short-term effects of oleoyl-estrone on insulin sensitivity and glucose disposal in the rat. *Int J Obesity*. 2002;26 Suppl 1:S204 (abstract).
 - 31 Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing and appetite-stimulating peptide from stomach. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2004;18:517–530.
 - 32 Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regul Pept*. 2005;126:11–19.
 - 33 Gutzwiller JP, Degen L, Matzinger D, Prestin S, Beglinger C. Interaction between GLP-1 and CCK-33 in inhibiting food intake and appetite in men. *Am J Physiol*. 2004;287:R562–R567.
 - 34 Moran TH, Field DG, Knipp S, Carrigan TS, Schwartz GJ. Endogenous CCK in the control of gastric emptying of glucose and maltose. *Peptides*. 1997;18:547–550.
 - 35 Herranz R. Cholecystokinin antagonists: pharmacological and therapeutic potential. *Med Res Rev*. 2003;23:559–605.
 - 36 Matson CA, Reid DF, Cannon TA, Ritter RC. Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *Am J Physiol*. 2000;278:R882–R890.
 - 37 Peters JH, Karpel AB, Ritter RC, Simasko SM. Cooperative activation of cultured vagal afferent neurons by leptin and cholecystokinin. *Endocrinology*. 2004;145:3652–3657.
 - 38 Jo YH, Chen YJJ, Chua SC, Talmage DA, Role LW. Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron*. 2005;48:1055–1066.
 - 39 López-Martí J, Díaz-Silva M, Salas A, Grasa MM, Fernández-López JA, Remesar X, et al. Oleoyl-estrone induces the massive loss of body weight in Zucker fa/fa rats fed a high-energy diet. *J Nutr Biochem*. 2000;11:530–535.
 - 40 Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. 1999;22:221–232.
 - 41 Attele AS, Shi ZQ, Yuan CS. Leptin, gut, and food intake. *Biochem Pharmacol*. 2002;63:1579–1583.

6. Site-specific modulation of white adipose tissue response to oral oleoyl-estrone and/or rosiglitazone in overweight male rats

Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernández-López, Alemany M. Treball enviat a Diabetes (Octubre, 2007).

Title**Site-specific modulation of white adipose tissue response to oral oleoyl-estrone and/or rosiglitazone in overweight male rats****Short title:**

Oleoyl-estrone and rosiglitazone effects on WAT sites

Authors

Raquel Ferrer-Lorente, Cristina Cabot, José Antonio Fernández-López and Marià Alemany

Affiliation:

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona Spain and Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03) Instituto de Salud Carlos III. Spain

Corresponding Author:

Prof. Marià Alemany PhD. Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Biology, University of Barcelona. Av. Diagonal, 645; 08028 Barcelona; Spain.

tel. +34 93 403 46 06; fax: +34 93 403 70 64; e-mail: malemany@ub.edu

Reprint requests to corresponding author

Disclosure Summary:

MA and JAFL have equity interests in OED SL, a spinoff company of the University of Barcelona. RFL was employed by OED during this study. JAFL and MA are inventors (patent WO02/076465), and MA is an inventor (patent: EC96500140.7-2107/US5,787,348, and applications US10/969,249 and US10/969,250 and P200602751, Spain) on oleoyl-estrone and its uses..

Grants:

PI052179 Fondo de Investigaciones Sanitarias (Spain); SAF2006-05134 Plan Nacional de Investigación en Biomedicina (Spain);

Abstract

Objective: To gain insight on the shared effect decreasing insulin resistance by oleoyl-estrone (OE) and rosiglitazone (RG), in spite of diverging action on body fat mass and distribution

Research design and methods: Combined effects OE and RG 10-day treatment on white adipose tissue (WAT) lipid content, cell size/content and the expression of adipocytokines and key metabolic and regulatory agents were studied on a model of adult male overweight Wistar rats.

Results: Circulating peptides suggested that maintained glycemia may be the key of OE control of food intake. OE decreased WAT cell size, and lipids, unchanged by RG. OE and RG effects were more marked in small-cell WAT. OE decreased the expressions of lipogenic and glucose- or lipid-importing enzymes, effects symmetrically reversed by RG. OE also decreased the expression of adrenergic and insulin signaling, PPARs C/EBPs and SREBP1c WAT, the levels of adiponectin and leptin, and the expression of resistin, all cytokines increased by RG

Conclusions: Both agents decreased insulin and maintained glycemia, decreasing insulin resistance. There is some synergism between RG and OE on insulin resistance, but not on fat mobilization. Combination of OE and RG induced less fat loss than OE alone. Thiazolidinedione-induced site-specific fat accumulation can be corrected by OE co-administration. The opposed gene expression pattern between RG and OE, and their consequences on body fat suggest that they may partly act

along the same path but with reversed directions, as exemplified by WAT cytokines.

Key words: oleoyl-estrone; rosiglitazone; adipose tissue; lipogenesis; insulin resistance

Introduction

Thiazolidinediones, such as rosiglitazone (RG) (1) are powerful antidiabetic drugs that act mainly through the PPAR γ receptors (2,3), modulating fatty acid synthesis (3) and adipocyte differentiation (4,5). The main sought for physiological effect of PPAR γ activation (and, consequently, that of thiazolidinediones) is a marked decrease in insulin resistance (6), but thiazolidinediones also modify adipocyte differentiation decreasing angiogenesis in white adipose tissue (WAT) (7).

The use of thiazolidinediones often results in unwanted modifications in the distribution of body fat (8), as well as in net increases in body fat storage (9), both unwanted secondary effects of their use as antidiabetic drugs, which limits their effective application to people already obese (9).

Oleoyl-estrone (OE) is a ponderostat signal (10) synthesized in WAT and carried by plasma lipoproteins that elicits a marked dose-dependent loss of body energy (mainly lipid, since protein is largely spared) (11,12). Treatment with OE reduced voluntary food intake (12) but maintains energy expenditure (13), thus creating a wide energy gap that is fulfilled at the expense of internal lipid (mainly WAT) stores (14).

OE markedly decreases circulating cholesterol (15) by increasing plasma lipid turnover and the selective utilization of lipid by muscle, at least in obese rats (16). Along this energy ordeal, glucose levels are maintained unchanged, within the normalcy range (12). In spite of decreased food intake, glucose availability is maintained, with liver glycogen stores untapped or even increased (14) in contrast with the situation experienced by pair fed (17) or food-restricted (18) rats under comparable conditions of energy availability. OE decreases circulating leptin and insulin (12), but also decrease adiponectin (18). The matched decrease in insulin and unchanged glycemia point to increased insulin sensitivity, but the overall glucose utilization is decreased (19) under unchanged muscle glucose transporter expression and maintained ability of the liver to use glucose for lipogenesis (20).

Since both thiazolidinediones and OE decrease insulin resistance (1), but their effects on WAT are widely different and largely site-specific, we investigated whether the mechanisms through which they elicit their effects on WAT metabolism and its regulation can achieve a similar insulin resistance effect with so much different overall effects on energy metabolism, specifically centered on WAT by using a 10-day oral OE and/or rosiglitazone (RG) treatment.

Materials and Methods

Animals and experimental setup

Male Wistar rats (Harlan-Interfauna, Sant Feliu de Codines, Spain) of 45 days were used; they weighed initially 190-220 g. The rats were maintained in a controlled environment: 21.5-22.5 °C; 80 % relative humidity; lights on from 08.00 to 20.00; they were kept in collective cages, and were fed for five weeks a reduced cafeteria diet (21) *ad libitum*. At the end of this phase, the animals were already overweight. The rats were re-conditioned during an additional week with standard rat chow *ad libitum* (maintenance chow, Panlab, Barcelona, Spain) as sole food. They were used in the ensuing experiment at this point, when their age was 90 days, as previously described (21).

The experimental setup and procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona. All animal handling procedures were carried out following the guidelines established by the EU, and the Spanish and Catalan Governments.

All animals received a daily gavage of 0.2 ml sunflower oil at the beginning of the light cycle, and were maintained under standard conditions with full access to food pellets; their weights and food consumption were recorded daily. Four groups of 6 animals were randomly selected: a) Control

group; b) oleoyl-estrone (OE); c) rosiglitazone (RG); and d) rosiglitazone + oleoyl-estrone (RG+OE). The gavage contained 10 $\mu\text{mol/kg}$ BW per day oleoyl-estrone (OED, Barcelona, Spain) for groups b) and d), and 5 mg/kg BW per day rosiglitazone (RG) (Pharma Chem Lansheng Corp, Shanghai, China) for groups c) and d).

Body composition analyses

The treatments continued for 10 days. At the end of the experiment, the rats were killed by decapitation. Blood serum was stored at -80°C until processed. The rats were dissected, and the stomach and intestinal contents were removed. The white adipose tissue masses: bilateral retroperitoneal, epididymal, and subcutaneous ventral inguinal strips, as well as the mesenteric mass were dissected, weighed and frozen. They were used for the analysis of lipids (22). The carcass was used for the estimation of lipid (22), and energy content, using a bomb calorimeter (C-7000 Ika, Heitersheim, Germany). Paste composition was related to in vivo weight as previously described (36), correcting the results for the weight and lipid content of WAT samples. Energy intake was calculated from the energy content of the food pellets and food intake. Rat chow had a mean energy content (bomb calorimeter) of 16.37 ± 0.04 kJ/g, with metabolisable energy of 13.3 kJ/g when discounting fibre, and assuming 95 % efficiency in nutrient assimilation. Energy accrual was the difference between estimated energy on day 0 and the measured energy content (bomb calorimeter) on day 10. Mean energy expenditure was estimated as the difference between energy intake and net energy accrual.

Serum analyses

Blood serum was used for the measurement of glucose (Trinder kit, Sigma, St Louis MO USA), non-esterified fatty acids (NEFA kit, Wako Chemicals, Neuss, Germany), total triacylglycerols (kit 11528, Biosystems, Barcelona, Spain), and total cholesterol (Cholesterol reagent easy, Menarini, Firenze Italy). Insulin (SRI-13K, Linco, St Charles, MO USA), leptin (RL-83K, Linco), adiponectin (MADP-60HK, Linco), cholecystokinin (kit RB-302, Euro-Diagnostics, Malmö, Sweden), ghrelin (kit RK-031031, Phoenix Europe, Karlsruhe, Germany) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (kit GLP-1T-36HT, Linco) were estimated in serum through specific radioimmunoassays.

WAT cellularity estimation

WAT samples were used for the estimation of total DNA (23), thus allowing the calculation of the number of cells per g of tissue and in the whole adipose tissue mass, based on the assumption that the DNA content per cell is constant in mammals; here we used the genomic DNA size data (24) for somatic rat cells (5.60 pg/cell). Total WAT cell numbers included not only adipocytes, but macrophages and other minority types of cells as well. Mean cell weight was estimated from the number of cells and the weight of the organ,

Semiquantitative real time PCR measurement of specific mRNAs concentrations in WAT

We used a previously described semiquantitative method (25) that allows the comparison of different organs and genes through the estimation of the number of copies for each specific mRNA per cell.

Total tissue RNA was extracted using the Tripure reagent (Roche Applied Science, Indianapolis IN USA), and were quantified in a ND-100 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington DE USA). RNA samples were reverse transcribed using the MMLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI USA) and oligo-dT primers.

Real-time PCR (RT-PCR) amplification was carried out using 10 μL amplification mixtures containing Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA USA), equivalent to 8 ng of reverse-transcribed RNA and 300 nM primers. Reactions were run on an ABI PRISM 7900 HT detection system (Applied Biosystems) using a fluorescent threshold manually set to OD 0.500 for all runs. The primers used for the estimation of gene expression are presented in Table S1 of the Supplemental online material.

We can directly correlate the amount of cDNA used in a reaction vessel to a given weight of the tissue after applying corrections for the process efficiency, thus, we can establish the approximate number of copies of the given mRNA per g of tissue or in the whole organ. These calculations allow us to

present the concentration of each specific mRNA in molar units, or to express the value as the mean number of mRNA copies per cell simply by applying the Avogadro number (6.022×10^{23} molecules per mol). Since a critical step is only an approximate (not measured) value (i.e. the efficiency of the reverse transcriptase step) we present these data as simple approximations to the real figures (semiquantitative approach).

Statistical analyses

Statistical comparisons between groups were established by one-, two- or three-way ANOVAS, and the *post-hoc* Bonferroni test, using the programs Stratagraphics plus 5.1 (Manugistics, Rockville, MD USA) and Prism 4 (GraphPad, San Diego CA USA).

Results

Figure 1 shows the relative changes in body weight experienced by the four groups of rats during the 10-day treatment. Rats treated with OE lost weight consistently along the whole period, RG alone increased weight more than controls, and decreased the loss of weight induced by OE when given in combination. Table 1 presents the absolute changes in body weight: OE significantly decreased and RG significantly increased body weight and food intake. OE induced a 43 % lipid loss, which translated in the loss of 29 % of whole body energy in 10 days, but no significant changes were observed for body protein. RG did not affect significantly the rat body composition.

Figure 2 depicts the energy balance of the four experimental groups. OE and RG did not change energy expenditure, but the management of energy stores was completely different: rats treated with OE markedly decreased energy intake and covered the energy gap with massive use of stored energy (mainly lipid), both when administered alone or in combination with RG. On the other hand, RG maintained (vs. controls) energy intake resulted in a small net storage of energy. The changes in energy storage elicited by OE and RG were largely additive in their combined administration.

Neither OE nor RG affected glycemia and non-esterified fatty acids (Table 2), but both decreased the levels of circulating triacylglycerols. OE decreased and RG increased circulating cholesterol. OE decreased insulin, ghrelin, leptin, adiponectin and GLP-1, leaving unchanged cholecystokinin. RG, on its part, decreased insulin and leptin and increased adiponectin and cholecystokinin.

The cellularity and lipid content of the four tested WAT sites are presented in Table 3. The mean cell size showed ample variation, with larger cells in retroperitoneal and epididymal and smaller cells in the mesenteric site. No significant changes in cell numbers were observed. Mean cell mass showed an overall OE-induced trend to decrease, in parallel to the total mass of the tissue, the percentage of lipids and the mean cell lipid content. No overall effects were observed with RG.

The body lipid stored in the combined four WAT sites analyzed is about one third of the total in controls, which means that the lipids outside these four sites (i.e. other locations, rest of subcutaneous WAT, intramuscular and liver lipid, etc.) are a larger share of the total body lipid reserves. The lipid present in these other locations was 52.9 ± 12.2 g in controls, 26.0 ± 7.4 g in OE, 33.6 ± 5.8 g in RG and 26.2 ± 1.0 g in OE+RG, which represents about 69 %, 58 %, 59 % and 64 % of the total, respectively, when expressed as percentages of total body lipid. There was a significant effect of OE ($P = 0.0379$), and that of RG was not significant.

Table 4 shows the mean number of transcripts per cell for a number of key energy metabolism and storage indicators. In general, the effects of OE and RG were markedly different: OE induced a generalized depression of energy metabolism indicators in all WAT sites, whereas RG increased them, but did so mainly in mesenteric and subcutaneous sites, with little (and even contrary effects) on retroperitoneal and, to a lower extent in epididymal WAT.

In the four sites tested, OE markedly decreased the expression of GLUT4, lipoprotein lipase (not in retroperitoneal WAT), adiponutrin, fatty acid synthase, and acetyl-CoA carboxylase. In subcutaneous WAT, OE decreased the expression of fatty acid transporting protein. Expression of fatty acid binding protein was significantly decreased by OE, but the individual site changes were significant only for mesenteric WAT, and reversed in subcutaneous WAT. OE also decreased the overall expression of

perilipins. RG elicited an increase in the expression of carnitine: palmitoleoyl-transferase with no changes induced by OE. RG also stimulated the expression of fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase, adiponutrin and fatty acid transporting protein in most sites. RG also induced global increases in the expression of GLUT4, lipoprotein lipase, and fatty acid binding protein.

WAT tissue regulatory agent expressions are depicted in Table 5. There are marked differences between sites, with OE inducing a generalized decrease in the expression of the β_1 adrenergic receptors and the phosphodiesterase, as well as a decrease in epididymal β_3 and an increase in retroperitoneal β_2 adrenergic receptors.

Expression of PPAR α , PPAR β , and PPAR γ 1 receptors globally decreased by OE treatment, and PPAR γ 2 expression decreased in subcutaneous and epididymal WAT. OE decreased globally the expression of the insulin receptor, IRS-1 and SREBP1c. OE decreased the expression of C/EBPs, which were more marked in subcutaneous and mesenteric WATs. In spite of the differences between sites being significant, RG-induced increases globally the expression of IRS-1, PPAR β , PPAR γ 1 and PPAR γ 2, with a small (albeit significant) decrease in the retroperitoneal WAT expression of PPAR β .

Table 6 presents the expression of WAT cytokines. OE induced global decreases in the expression of adiponectin, resistin, and leptin. TNF α expression was globally decreased, but no significant effects were observed for any specific site. OE induced no significant changes in visfatin expression. The effects of RG on adipocytokine expressions were even more limited; there were generalized increasing effects only for adiponectin and resistin, essentially due to the marked effects on subcutaneous and mesenteric WATs, since retroperitoneal WAT showed an actual decrease in the expression of adiponectin (and leptin). Leptin expression was increased by RG in subcutaneous and visfatin expression was also increased in mesenteric WAT.

Discussion

As expected (12), OE induced a marked loss of body lipid (and energy), consequence of the energy gap created by decreased food intake and maintained energy expenditure (12). RG actually increased body weight (8), again a consequence of slightly increased food intake and maintained energy expenditure.

The decrease in food intake elicited by OE are not directly related to increases in the circulating levels of the main anorexigenic agents: cholecystokinin (26), leptin (27), and GLP-1 (28), since the first was unchanged, and the latter actually decreased; OE did not directly change orexigenic ghrelin (29), but decrease its levels raised by RG. Probably, the key for OE-induced decrease in food intake is the maintenance of glycemia; in spite of massive use of the body reserves, glucose levels and availability are maintained (12) so that even liver glycogen stores increase, because peripheral utilization of glucose is decreased (19). Maintained glycemia results in decreased food intake (17). Alternatively, OE may directly control satiety, but not through decreased hypothalamic neuropeptide Y (30).

RG increased (31) and OE (32) decreased circulating cholesterol, in agreement with the OE-enhanced utilization of lipoproteins because of higher muscle lipoprotein lipase activity (16), and the relative hypercholesterolemia (33) and increased expression of WAT lipoprotein lipase caused by RG.

WAT mean cell size was lower in mesenteric and largest in retroperitoneal WAT, in fact "small cell WATs" (i.e. subcutaneous and mesenteric) showed different effects of OE and RG on enzymes and regulatory protein expressions than the "large cell WATs" (i.e. retroperitoneal and epididymal). Evidently, the "mean tissue cell size" does not correspond to mean adipocyte size, since WAT contains other cell types with specific structural, proliferative, regulatory and immune roles (34). The proportions of non-adipocyte cells in WAT sites is not uniform (35), but the "mean cell" data can be construed as an approximation to the adipocyte size, since by all counts adipocytes represent the largest number of WAT cells (36), and contain practically all tissue lipids. Largest cells contained more lipid than the smallest, and were less responsive. Overall effects on cell size and lipid content induced by OE were more marked in subcutaneous, less marked in retroperitoneal and mesenteric, and did not affect significantly the epididymal.

Gene expression responses to RG or OE of WAT sites can be ranked: subcutaneous > mesenteric > epididymal > retroperitoneal in a list that is close to that of mean cell size or lipid content, and seems unrelated to ubication (all are intraabdominal except the subcutaneous) or venous drainage. These data hint at WAT cell size being a major determinant on the activity and responsiveness of the cells to regulatory agents, in agreement with reports that establish that mature (large) adipocytes show a cytokine, and hormone responsiveness (37) different from the young, growing or just differentiated cells (37). Leptin synthesis is known to be higher in subcutaneous (38) (small cells) than in abdominal cells (usually perigonadal or retroperitoneal, seldom mesenteric, probably the only true "visceral" WAT).

OE induced a marked depression in the metabolic activity of WAT, as previously observed in liver (20); OE decreased the glucose uptake capability (lowered GLUT 4 expression), which may help shift the coverage of the tissue energy needs to the usage of lipids; this decrease in glucose availability agrees with the observed decrease in the expression of lipogenic enzymes acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase.

The expression of adiponutrin, a highly sensitive indicator of lipid anabolism (39) was dramatically inhibited by OE treatment in all four WAT sites studied. However, lipid mobilization was not uniform, depending on the specific location of the adipose depot as previously described (40). Lipoprotein lipid incorporation into WAT stores was also diminished, as shown by the low expression of lipoprotein lipase, which agrees with the lowered enzyme activity observed in obese rats treated with OE (16).

RG, on the other side enhanced lipogenesis, by increasing the expression of lipogenic enzymes and indicators (adiponutrin), but also increasing the potential entry of glucose (higher expression of GLUT4) and extra-WAT lipids (lipoprotein lipase). These clearly positive effects, circumscribed to small cell WATs, and in part to epididymal WAT, are counteracted by increased expression of carnitine palmitoleoyl-transferase, responsible of the incorporation of acyl-CoA to the mitochondrion for its ensuing complete oxidation (41).

The frankly lipogenic and more compartmentalized (essentially in "small cell WATs") effects of RG contrast with the more generalized depression of lipogenesis induced by OE; the expression of perilipins follow this pattern, with lowered expression in shrinking cells of rats treated with OE and increased expression in lipogenesis-prone and tending to grow adipocytes of RG-treated animals in agreement with previously published reports (42). The site-related differences of RG action agree with its known differential enhancement of adipogenesis in only selected sites (43), which has been considered one of its main drawbacks for generalized use, especially in obese individuals.

In OE-treated rats, SREBP1c expression is decreased in all WAT sites except the mesenteric, in parallel to markedly decreased expression of lipogenic enzymes, such as acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase, which agrees with the known role of SREBP1c stimulating lipogenesis through enhanced expression of these lipogenic enzymes (44). In the RG rats the effects are the reverse: SREBP1c expression was increased in subcutaneous and mesenteric WAT, in parallel to the increases of acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase expression in these sites; but also in retroperitoneal WAT. These data and the lack of a significant accrual of cell lipids suggests that the control of the expression of lipogenic enzymes may be necessary but not enough to promote an actual accrual of lipid, and, also, that other control paths, in addition to SREBP1c may influence their activation in RG- (and OE-) treated rats.

In addition to depressed glucose uptake, lipoprotein lipase and lipogenesis, OE decreased the expression of β_1 adrenergic receptors, adiponectin, and leptin. This is apparently contradictory, since: a) enhancing adrenergic signaling –exemplified by depressed phosphodiesterase 3– is a key element in the mobilization of fat, b) adiponectin secretion decreases insulin resistance, and c) leptin decreases appetite and helps mobilize fat through hypothalamic control. However, OE decreases insulin resistance (45), lowers appetite (38), and mobilizes fat, either directly (12) or through central effects (46,47). It seems, thus, that OE acts through a path not dependent of the key regulatory agents that are depressed by OE itself. It can be postulated that OE may act upstream of them, as is the case of leptin (10), in such a way that a OE surge may result in a generalized depression of the other parallel

or downstream mechanisms.

The effect of OE and RG on the expression of C/EBP α and C/EBP β shows marked differences in their mechanisms of action: RG practically left them unaltered, but OE induced generalized decreases in their expression, more marked in smaller cell WATs than in the fairly insensitive retroperitoneal tissue, which agrees with one of the known effects of OE on WAT: decreasing the number of cells (40) through increased apoptosis (48); in this case, the decreased expression of the C/EBPs, known adipose tissue proliferative agents (49) hints that OE may decrease adipogenesis in addition to curtailing tissue growth.

OE also decreases the global expression of PPAR γ 1, and that of PPAR γ 2 in epididymal and subcutaneous WAT. These effects do not seem to bear a direct relationship with the control of lipogenesis or cell fat content. Thiazolidinediones act through stimulation of PPAR γ (2), thus, a prolonged treatment with an agonist such as RG can be expected to induce a down-regulation of the receptors, at least in mature cells (42). Surprisingly, we observed the opposite effect. The downstream of PPAR γ stimulation by RG was, as expected, an enhancement of lipogenesis and a practically point-by-point reversal of the OE effects on gene expression, but circumscribed to subcutaneous and mesenteric WAT. The opposed pattern of gene expression of RG and OE, and the combined effect of these changes on body fat distribution suggest that they may act in part through the same path but with reversed directions, as shown by the signals emitted by WAT: leptin, adiponectin, resistin and, to a much lower extent, TNF α and visfatin. In spite of this frank opposition, both agents decreased insulin and maintained glucose levels, effectively decreasing insulin resistance. This last unifying act attests to the intricate regulation of glucose homeostasis, and goes directly to the common basis of the pathogenesis of the metabolic syndrome, as well as the ever growing relationship between steroid hormone and insulin functions (50). Much more work is needed to find out both how OE works and the actual role of PPARs in the control of cell energy homeostasis.

In any case, and looking from a practical point of view, we can conclude that the combination of OE and RG results in perhaps lesser losses of fat than with OE alone, but glucose homeostasis is better accomplished and, especially, the site-specific fat accumulation induced by thiazolidinedione use can be corrected by the parallel administration of OE. There is a certain degree of synergism between RG and OE on the question of insulin resistance, but not on fat mobilization, suggesting that their combined use may be ultimately positive for type 2 diabetics that are already obese or that show a marked predisposition to the accumulation of fat.

Acknowledgments

The financial and material help of OED for the development of this study is acknowledged.

References

- 1 Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes*, 45: 1661-1669, 1996
- 2 Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, 270(22):12953-6, 1995
- 3 Spiegelman BM. PPAR-g: Adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 47 (4): 507-14, 1998
- 4 Albrektsen T, Fredriksen KS, Holmes WE, Boel E, Taylor Km Fleckner J. Novel genes regulated by the insulin sensitizer rosiglitazone during adipocyte differentiation. *Diabetes*, 51(4):1042-5, 2002
- 5 Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent.

- Mol Pharmacol*, 41(2):393-8, 1992
- 6 Lebovitz HE, Banerji MA. Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones. *Recent Prog Horm Res* 56: 265-294, 2001
 - 7 Margeli A, Kouraklis G, Theocharis S. Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma) ligands and angiogenesis. *Angiogenesis* 6: 165-169, 2003
 - 8 Carey DG, Cowin GJ, Galloway GJ et al. Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients. *Obes Res* 10: 1008-15, 2002
 - 9 Fonseca V. Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am J Med* 115 (58A): 42S-48S, 2003
 - 10 Adán C, Cabot C, Vilà R, Grasa MM, Masanés RM, Esteve M, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *Int J Obes*, 23: 366-373, 1999
 - 11 Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Montserrat C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes* 20: 588-594, 1996.
 - 12 Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay MT, Vilà R, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res*, 9: 202-209, 2001
 - 13 Sanchis D, Balada F, Picó C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, Palou A, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Rats receiving the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Arch Physiol Biochem* 105: 663-672, 1997
 - 14 Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Monserrat C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Short-term handling of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) by the rat. *Mol Cell Biochem* 177: 153-157, 1997
 - 15 Cabot C, Salas A, Ferrer-Lorente R, Savall P, Remesar X, Fernández-López JA, Esteve M, Alemany M. Short-term oral oleoyl-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *Int J Obes*, 29: 534-539, 2005
 - 16 Blay M, Peinado-Onsurbe P, Grasa MM, Díaz-Silva MM, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *Int J Obes*, 26: 618-626, 2002
 - 17 Salas A, Esteve M, Grasa MM, Remesar X. Rats treated with oleoyl-oestrone maintain glucidic homeostasis: comparisons with a pair-fed model. *Br J Nutr* 94:738-745, 2005
 - 18 Romero M, Esteve M, Alemany M. Combined effects of oral oleoyl-estrone and limited food intake on body composition of young overweight male rats. *Int J Obes* 30:1149-1156, 2006
 - 19 Grasa MM, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone decreases rat plasma insulin, leptin and adiponectin, lowering muscle and BAT glucose uptake. *Int J Obes* 27 (Suppl 1): S43, 2003
 - 20 Romero MM, Esteve M, Fernández-López JA, Lukic T, Harris AG, Alemany M. Oleoyl-estrone regulates lipogenesis in the liver of overweight rats through modulation of ChREBP and SREBP1c. NAASO Congress, New Orleans, October 2007
 - 21 Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effects of oleoyl-estrone with dexfenfluramine, sibutramine or phentermine on overweight rats. *Eur J Pharm* 513: 243-248, 2005
 - 22 Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 232: 497-509, 1957
 - 23 Her PA, Hammond RP, Homolsky MW. Sodium pump activity during norepinephrine-

- stimulated respiration in brown adipocytes. *Am J Physiol* 224: 1300-1304, 1973
- 24 Rat Genome Sequencing Project Consortium 2004 Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493-521, 2004
 - 25 Romero MM, Grasa MM, Fernández-López JA, Esteve M, Alemany M. Semiquantitative RT-PCR measurement of gene expression in rat tissues including a correction for varying cell size and number. *Nutr Metab* (In the press) 2007
 - 26 Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 84: 488-495, 1973
 - 27 Shimizu H, Inoue K, Mori M. The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. *J Endocrinol* 193: 1-9, 2007
 - 28 Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD. Intravenous infusion of peptide YY(3-36) potently inhibits food intake in rats. *Endocrinology* 146: 879-888, 2005
 - 29 Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50: 2540-2547, 2001
 - 30 Cabot C, Grasa MM, Adán C, Pérez-Clausell J, Virgili J, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoil-estrone does not alter hypothalamic neuropeptide Y in Zucker lean and obese rats. *Peptides* 19: 1631-1635, 1998
 - 31 Sheen AJ. Current management strategies for coexisting diabetes mellitus and obesity. *Drugs* 63: 1165-1184, 2003
 - 32 Cabot C, Salas A, Ferrer-Lorente R, Savall P, Remesar X, Fernández-López JA, Esteve M, Alemany M. Short-term oleoil-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *Int J Obes* 29: 534-539, 2005
 - 33 Shim WS, Do MY, Kim SK, Kim HJ, Hur KY, Kang ES, Ahn CW, Lim SK, Lee HC, Cha BS. The long-term effects of rosiglitazone on serum lipid concentrations and body weight. *Clin Endocrinol* 65: 453-459, 2006
 - 34 Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Pénicaud L. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J* 13: 305-312, 1999
 - 35 Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res* 312: 727-736, 2006
 - 36 Hauner H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav* 83: 653-658, 2004
 - 37 Fève B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin En* 19: 483-499, 2005
 - 38 Hube F, Lietz U, Igel M, Jensen PB, Tornqvist H, Joost HG, Hauner H. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res* 28: 690-693, 1996
 - 39 Liu YM, Moldes M, Bastard JP, Bruckert E, Viguerie N, Halinque B, Basdevant A, Langin D, Pairault J, Clément K. Adiponutrin: a new gene regulated by energy balance in human adipose tissue. *J Clin End* 89: 2684-2689, 2004
 - 40 Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM, Alemany M. Effect of oral oleoil-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obes*, 26: 1092-1102, 2002
 - 41 McGarry J, Woeltje K, Kuwajima M, Foster D. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev* 5:271-284, 1989
 - 42 Takamura T, Nohara E, Nagai Y, Kobayashi K. Stage-specific effects of a thiazolidinedione on proliferation, differentiation and PPAR γ mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol* 422: 23-29, 2001
 - 43 Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazar MA, Chatterjee KK, O'Rahilly S. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor γ have depot-specific effects of human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100: 3149-3153, 1997 KG: depen

- 44 Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hastay AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *Journal Biol Chem* 274: 35832-35839, 1999
- 45 Guerre-Millo M, Gervois P, Raspé E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor α activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 275: 16638-16642, 2000
- 46 Adán C, Cabot C, Vilà R, Grasa MM, Masanés RM, Esteve M, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *Int J Obes* 23: 366-373, 1999
- 47 Vasselli JR, Currie PJ, Lukic T, Harris AG. Centrally-injected oleoyl-estrone reduces feeding and body weight in rats. *Diabetologia* 50 (Suppl 1): S22. Abstract 0039, 2007
- 48 Salas A, Esteve M, Remesar X. Oleoyl-estrone treatment activates apoptotic mechanisms in white adipose tissue. *Life Sci* 80: 293-298, 2007
- 49 Rangwala SM, Lazar MA. Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr* 20: 535-539, 2000
- 50 Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D, Steiler TL, Dahlman-Wright K, Nilsson S, Gustafsson J, Efendic S, Khan A. Evidence that oestrogen receptor- α plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 49: 588-597, 2006

TABLE 1 - Body weight, food intake and composition changes of young overweight male Wistar rats treated with oral oleoyl-estrone and/or rosiglitazone

| parameter | units | control | OE | RG | RG + OE | P OE | P RG |
|--------------------------|--------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------|--------|
| body weight day 0 | g | 381 ± 16 ^A | 380 ± 6 ^A | 361 ± 18 ^A | 361 ± 8 ^A | NS | NS |
| body weight change | % | 2.4 ± 0.7 ^A | -13.7 ± 1.4 ^B | 6.1 ± 0.4 ^A | -7.2 ± 1.0 ^C | 0.0000 | 0.0001 |
| mean daily food intake | g | 18.41 ± 0.82 ^A | 8.41 ± 0.58 ^B | 20.01 ± 0.95 ^A | 12.25 ± 1.11 ^C | 0.0000 | 0.0040 |
| total body lipid (final) | g | 77.2 ± 10.0 ^A | 44.9 ± 7.6 ^B | 57.1 ± 9.0 ^{AB} | 41.6 ± 1.6 ^B | 0.0058 | NS |
| body lipid change | % of I | 10.5 ± 10.0 ^{AB} | -42.9 ± 4.9 ^A | 20.8 ± 22.1 ^B | -19.8 ± 12.6 ^{AB} | 0.0029 | NS |
| body protein change | % of I | 2.0 ± 3.5 ^A | -1.1 ± 3.8 ^A | 4.7 ± 11.1 ^A | -9.8 ± 4.7 ^A | NS | NS |
| body energy change | % of I | 4.4 ± 6.5 ^A | -29.3 ± 4.4 ^B | 5.3 ± 10.8 ^A | -16.1 ± 7.9 ^{AB} | 0.0021 | NS |
| liver weight | g | 11.60 ± 0.54 ^{AB} | 9.86 ± 0.59 ^A | 12.01 ± 0.52 ^B | 10.95 ± 0.25 ^{AB} | 0.0101 | NS |

The data are the mean ± sem of 6 different animals. OE =oleoyl-estrone; RG = rosiglitazone; Statistical differences between groups; P values obtained from two-way anova and the post-hoc Bonferroni test: different superindex letters represent significantly different groups (P < 0.05). No interactions were observed between OE and RG

TABLE 2 - Serum metabolites, hormones and active peptides of young overweight male Wistar rats treated with oral oleoyl-estrone and rosiglitazone

| serum parameter | units | control | OE | RG | RG + OE | P OE | P RG | P int |
|----------------------------|-------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------|--------|--------|
| glucose | mM | 7.69 ± 0.13 ^A | 7.17 ± 0.26 ^A | 7.71 ± 0.61 ^A | 7.63 ± 0.28 ^A | NS | NS | NS |
| triacylglycerols | µM | 2014 ± 89 ^A | 1010 ± 178 ^{BC} | 1400 ± 194 ^{ABC} | 835 ± 59 ^C | 0.0000 | 0.0210 | NS |
| total cholesterol | mM | 1.70 ± 0.09 ^A | 0.92 ± 0.08 ^B | 2.12 ± 0.12 ^C | 0.96 ± 0.09 ^B | 0.0000 | 0.0373 | NS |
| non-esterified fatty acids | µM | 496 ± 58 ^A | 482 ± 85 ^A | 374 ± 72 ^A | 326 ± 94 ^A | NS | NS | NS |
| insulin | pM | 536 ± 72 ^A | 319 ± 67 ^{ABC} | 269 ± 33 ^B | 282 ± 47 ^{CB} | NS | 0.0147 | NS |
| adiponectin | nM | 80.1 ± 5.1 ^A | 62.4 ± 4.8 ^A | 252 ± 26 ^B | 162 ± 15 ^C | 0.0000 | 0.0000 | 0.0027 |
| leptin | pM | 747 ± 31 ^A | 339 ± 52 ^{BC} | 547 ± 84 ^{AB} | 273 ± 28 ^C | 0.0000 | 0.0272 | NS |
| cholecystokinin | pM | 1.61 ± 0.09 ^A | 1.10 ± 0.30 ^A | 1.75 ± 0.13 ^A | 1.85 ± 0.15 ^A | NS | 0.0361 | NS |
| ghrelin | pM | 491 ± 54 ^{AB} | 422 ± 43 ^A | 667 ± 81 ^B | 367 ± 29 ^{AB} | 0.0106 | NS | NS |
| GLP-1 | pM | 50.5 ± 10.8 ^{AB} | 24.3 ± 2.0 ^A | 57.6 ± 1.7 ^B | 37.2 ± 2.0 ^{AB} | 0.0028 | NS | NS |

The data are the mean ± sem of 6 different animals. OE =oleoyl-estrone; RG = rosiglitazone; Statistical differences between groups; P values obtained from two-way anova and the post-hoc Bonferroni test: different superindex letters represent significantly different groups (P < 0.05). Int = interaction between OE and RG

TABLE 3 - Comparative cellularity and lipid content in WAT sites of rats treated with OE and/or RG site

| | units | ± RG | retroperitoneal | | epididymal | | subcutaneous | | mesenteric | | OE | | | | | RG | | | | | site | | | | | | | |
|---------------|------------------|---------|-----------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-----|----|-----|---|---|-----|---|---|---|---|------|-----|---|--|-----|-----|-----|--|
| | | | - OE | + OE | - OE | + OE | - OE | + OE | - OE | + OE | all | R | E | S | M | all | R | E | S | M | | | | | | | | |
| tissue weight | g | - RG | 11.81 ± 1.64 | 8.19 ± 0.69 | 10.37 ± 1.82 | 8.59 ± 0.53 | 4.31 ± 0.28 | 3.49 ± 0.31 | 2.65 ± 0.28 | 2.46 ± 0.22 | ∇ | ↓ | ↓ | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | + RG | 9.64 ± 1.89 | 6.96 ± 0.48 | 9.66 ± 1.59 | 6.25 ± 0.51 | 5.12 ± 0.45 | 3.54 ± 0.12 | 2.58 ± 0.45 | 1.65 ± 0.12 | *** | * | ** | | | | | | | | | | | | | | | |
| cell number | x10 ⁶ | - RG | 431 ± 70 | 340 ± 69 | 359 ± 45 | 439 ± 32 | 309 ± 37 | 274 ± 28 | 231 ± 16 | 414 ± 24 | | | | | | | | | | | | | | | *** | | | |
| | | + RG | 335 ± 68 | 359 ± 59 | 403 ± 62 | 370 ± 71 | 311 ± 20 | 249 ± 31 | 223 ± 37 | 184 ± 18 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cell mass | ng | - RG | 28.1 ± 1.8 | 29.0 ± 6.0 | 24.9 ± 1.3 | 22.4 ± 1.9 | 15.3 ± 2.5 | 13.6 ± 1.4 | 11.8 ± 0.6 | 5.6 ± 0.6 | ∇ | | | | | | | | | | | | | | | *** | | |
| | | + RG | 23.6 ± 2.5 | 19.0 ± 3.2 | 19.2 ± 0.6 | 18.0 ± 2.0 | 21.1 ± 2.9 | 12.9 ± 1.0 | 12.0 ± 1.2 | 8.7 ± 0.7 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cell lipid | ng | - RG | 24.5 ± 1.6 | 24.8 ± 5.2 | 22.7 ± 1.0 | 20.1 ± 1.9 | 11.2 ± 1.9 | 10.2 ± 1.2 | 8.7 ± 0.6 | 4.1 ± 0.4 | ∇ | | | | | | | | | | | ↓ | | | | | *** | |
| | | + RG | 20.3 ± 2.4 | 16.3 ± 2.8 | 17.0 ± 0.5 | 15.1 ± 1.4 | 16.6 ± 2.8 | 8.4 ± 0.6 | 11.9 ± 2.6 | 6.1 ± 1.1 | ** | | | | | | | | | | | * | | | | | | |
| lipids | % | - RG | 87.3 ± 0.4 | 86.1 ± 0.4 | 88.3 ± 0.6 | 87.8 ± 1.4 | 72.4 ± 2.4 | 70.9 ± 2.9 | 76.7 ± 1.8 | 74.8 ± 2.2 | ∇ | ↓ | | | | | | | | | | ↓ | | | | | | |
| | | + RG | 87.6 ± 0.7 | 85.8 ± 0.2 | 88.1 ± 0.8 | 86.7 ± 0.7 | 76.3 ± 2.5 | 66.4 ± 2.0 | 79.3 ± 2.7 | 75.1 ± 3.3 | ** | ** | ** | * | | | | | | | | * | | | | | | |
| tissue lipid | g | - RG | 10.31 ± 1.45 | 6.96 ± 0.58 | 8.91 ± 1.81 | 7.57 ± 0.55 | 3.14 ± 0.27 | 2.50 ± 0.28 | 1.96 ± 0.24 | 1.67 ± 0.12 | ∇ | ↓↓ | | | | | | | | | | ↓ | | | | | | |
| | | + RG | 8.10 ± 1.40 | 5.99 ± 0.43 | 8.55 ± 1.48 | 5.16 ± 0.47 | 3.91 ± 0.39 | 2.23 ± 0.09 | 2.89 ± 0.59 | 1.16 ± 0.18 | *** | * | *** | * | | | | | | | | *** | * | | | | | |

The data are the mean ± sem of 6 different animals. OE =oleoyl-estrone; RG =rosiglitazone; ↓↓↓ = decrease up to 60 % of controls; ↓↓ = decrease between 25 and 60 % of controls; ↓ = decrease to less than 25 % of controls; ↑↑ = increase up to 160 % of controls; ↑ = increase between 160 and 300 % of controls; ↑↑↑ = increase higher than 300 % of controls; statistical differences between groups: * = P between 0.05 and 0.01; ** = P between 0.01 and 0.001; *** = P lower than 0.001; three-way anova (all and site columns): ∇ = trend to decrease, ∧ = trend to increase; two-way anovas: R = retroperitoneal, E = epididymal, M = mesenteric, S = subcutaneous columns).

TABLE 4 - Comparative expression of lipid and energy metabolism indicators in WAT sites of rats treated with OE and/or RG

| gene | ± | | retroperitoneal | | epididymal | | subcutaneous | | mesenteric | | | OE | | | | | RG | | | | | site | | |
|-----------------------------------|------|---|-----------------|------------|------------|-----------|--------------|------------|------------|----------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|------|-----|-----|
| | RG | | - OE | + OE | - OE | + OE | - OE | + OE | - OE | + OE | - OE | + OE | all | R | E | S | M | all | R | E | S | | M | |
| GLUT4 | - RG | | 154±34 | 100±27 | 78±7 | 24±3 | 67±7 | 32±12 | 48±6 | 23±4 | | V | ↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ∧ | | | ↑↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | |
| | + RG | | 170±41 | 63±18 | 176±50 | 39±2 | 207±45 | 67±16 | 95±12 | 54±9 | | *** | * | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | *** | * |
| lipoprotein lipase | - RG | | 1300±292 | 1139±219 | 759±223 | 292±65 | 1143±258 | 397±148 | 290±101 | 141±27 | | V | | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ∧ | | | ↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | |
| | + RG | | 1222±361 | 420±189 | 1728±479 | 304±49 | 2871±390 | 879±237 | 972±284 | 278±91 | | *** | *** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | *** | *** | * |
| hormone-sensitive lipase | - RG | | 851±156 | 1167±194 | 585±64 | 580±67 | 300±39 | 236±55 | 274±12 | 217±17 | | | | | | | | | ∧ | | ↓ | ↑↑ | ↑ | |
| | + RG | 5 | 34±103 | 395±54 | 50±155 | 431±15 | 507±110 | 351±56 | 414±62 | 345±4 | | | | | | | | | ** | ** | ** | ** | ** | *** |
| carnitine palmit-oleoyl-transfer. | - RG | | 62±14 | 75±29 | 37±4 | 46±11 | 17±28 | 37±18 | 21±2 | 19±3 | | | | | | | | ∧ | | | ↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑ | |
| | + RG | | 101±11 | 100±19 | 70±15 | 66±7 | 62±5 | 59±8 | 59±2 | 66±7 | | | | | | | | *** | * | * | * | * | * | *** |
| adiponutrin | - RG | | 111±22 | 25±5 | 88±21 | 6.6±1.7 | 35±4 | 1.7±0.6 | 32±7 | 3.8±0.8 | | V | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ↓↓↓ | ∧ | | | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | |
| | + RG | | 176±36 | 52±25 | 389±105 | 21±5 | 469±101 | 14±3 | 203±59 | 24±8 | | *** | *** | ** | ** | ** | ** | *** | *** | * | * | * | * | ** |
| fatty acid synthase | - RG | | 1294±435 | 484±154 | 455±88 | 80±17 | 463±121 | 89±14 | 227±45 | 105±28 | | V | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ∧ | | | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | |
| | + RG | | 2021±336 | 758±277 | 2066±282 | 222±37 | 2516±836 | 444±107 | 1217±139 | 431±99 | | *** | ** | ** | ** | ** | ** | *** | *** | * | * | * | * | ** |
| acetyl-CoA carboxylase | - RG | | 54±11 | 41±9 | 38±11 | 11±2 | 42±16 | 11±3 | 10±3 | 9±2 | | V | ↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ∧ | | | ↑↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | |
| | + RG | | 100±23 | 38±16 | 222±57 | 18±3 | 295±44 | 30±7 | 88±28 | 29±10 | | *** | * | ** | ** | ** | ** | *** | *** | * | * | * | * | ** |
| fatty acid transporting protein | - RG | | 36±7 | 73±11 | 14±2 | 17±4 | 31±14 | 18±5 | 9.4±2.6 | 12±3 | | | | | | | | ∧ | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑↑ | |
| | + RG | | 47±12 | 36±11 | 34±9 | 22±2 | 89±9 | 37±4 | 29±7 | 32±8 | | | | | | | | *** | * | * | * | * | * | *** |
| fatty acid binding protein | - RG | | 25460±1256 | 19954±3878 | 14995±1773 | 12303±855 | 6451±919 | 8229±1613 | 7262±682 | 5258±759 | | V | | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ∧ | | | ↑↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | |
| | + RG | | 21308±2918 | 19118±3405 | 14350±3754 | 9652±424 | 26052±1697 | 13001±1385 | 16582±1378 | 9636±789 | | *** | *** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | *** | *** | *** |
| perilipins | - RG | | 627±152 | 552±128 | 309±64 | 172±43 | 219±32 | 98±22 | 124±28 | 83±13 | | V | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | | | | ↑↓ | ↑↓ | ↑↓ | |
| | + RG | | 243±23 | 135±49 | 360±76 | 163±9 | 452±110 | 203±50 | 277±66 | 123±32 | | *** | * | * | * | * | * | | | ** | ** | * | * | *** |

The data are the mean ± sem of 6 different animals and represent the mean number of mRNA transcripts per 10 cells. OE =oleoyl-estrone; RG = rosiglitazone; ↓ = decrease up to 60 % of controls; ↓↓ = decrease between 25 and 60 % of controls; ↓↓↓ = decrease to less than 25 % of controls; ↑ = increase up to 160 % of controls; ↑↑ = increase between 160 and 300 % of controls; ↑↑↑ = increase higher than 300 % of controls; statistical differences between groups: * = P between 0.05 and 0.01; ** = P between 0.01 and 0.001; *** = P lower than 0.001; three-way anova (all and site columns): V = trend to decrease; ∧ = trend to increase; two-way anovas: R = retroperitoneal, E = epididymal, M = mesenteric, S = subcutaneous columns.

TABLE 5 - Comparative expression of regulatory indicators in WAT sites of rats treated with OE and/or RG

| gene | retroperitoneal | | epididymal | | subcutaneous | | mesenteric | | OE | | | | | | RG | | | | | | site |
|------------------------|-----------------|----------|------------|----------|--------------|----------|------------|----------|----------|-----|----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|--|------|
| | - OE | + OE | - OE | + OE | - OE | + OE | - OE | + OE | all | R | E | S | M | all | R | E | S | M | | | |
| insulin receptor | -RG | 39±15 | 22±4 | 40±14 | 48±12 | 26±7 | 12±3 | 14±3 | 12±1 | V | | ↓↓ | | | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | | |
| | +RG | 19±2 | 11±4 | 62±21 | 45±6 | 47±9 | 27±6 | 30±9 | 19±5 | * | | * | | | | | ** | ** | ** | | |
| | -RG | 15±6 | 30±4 | 18±4 | 14±3 | 27±4 | 8.9±4.1 | 9±3 | 7.0±0.9 | V | | ↓ | ↓↓ | ∧ | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | | |
| IRS1 | +RG | 30±13 | 10±5 | 55±14 | 17±3 | 81±13 | 35±12 | 29±9 | 13±4 | *** | | * | *** | *** | | ** | *** | * | ** | | |
| | -RG | 2260±484 | 1178±354 | 1106±124 | 646±166 | 998±127 | 586±155 | 456±88 | 329±47 | V | ↓↓ | ↓↓ | | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | | |
| | +RG | 1305±170 | 768±247 | 1752±295 | 991±89 | 2491±533 | 580±158 | 1065±246 | 667±127 | *** | * | * | ** | *** | | * | * | ** | ** | | |
| adrenergic receptorβ1 | -RG | 122±32 | 66±10 | 104±24 | 65±9 | 69±11 | 26±5 | 48±6 | 29±7 | V | ↓ | ↓↓ | | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | | |
| | +RG | 79±18 | 49±10 | 118±23 | 44±5 | 142±8 | 62±18 | 79±11 | 40±5 | *** | | ** | *** | *** | | ** | *** | * | * | | |
| | -RG | 140±26 | 263±22 | 169±10 | 205±6 | 211±24 | 205±8 | 97±7 | 77±6 | | ↑↑ | | | | | ↑↑ | ↑ | ↑ | ↑ | | |
| adrenergic receptor β2 | +RG | 146±12 | 149±24 | 156±42 | 91±12 | 276±28 | 380±62 | 139±25 | 143±9 | | ** | ** | | | | * | *** | *** | *** | | |
| | -RG | 980±239 | 2006±199 | 1766±163 | 1095±179 | 455±59 | 299±59 | 684±144 | 581±24 | | ↓ | ↓ | | | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | | |
| | +RG | 1590±216 | 675±126 | 2034±662 | 840±136 | 760±139 | 880±232 | 1135±143 | 1269±114 | | * | * | | | | | ** | *** | *** | | |
| phosphodiesterase 3B | -RG | 7.2±1.7 | 9.2±2.8 | 8.3±2.1 | 8.9±1.9 | 7.1±2.5 | 2.9±0.5 | 4.1±0.9 | 2.8±0.5 | V | | | | | | ↓ | | ↑↑ | ↑↑ | | |
| | +RG | 5.3±0.9 | 3.5±0.9 | 17±6 | 6.1±0.5 | 11±1 | 3.7±0.9 | 8.0±2.3 | 4.8±1.3 | ** | | ** | | | | * | * | * | ** | | |
| | -RG | 19±9 | 16±4 | 17±4 | 6.7±1.8 | 14±3 | 6.3±1.9 | 8.3±1.6 | 5.1±0.9 | V | | ↓↓ | | | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | | |
| PPARα | +RG | 14±6 | 5.1±2.5 | 16±3 | 14±3 | 24±3 | 8.1±1.9 | 18±5 | 11±3 | *** | | *** | | | | | * | * | * | | |
| | -RG | 48±17 | 49±12 | 49±5 | 31±8 | 48±9 | 26±6 | 17±2 | 16±4 | V | ↓ | ↓↓ | ∧ | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | | |
| | +RG | 59±16 | 30±14 | 64±12 | 42±2 | 103±9 | 61±16 | 58±16 | 31±9 | *** | | * | *** | *** | * | * | *** | ** | ** | | |
| PPARγ1 | -RG | 76±15 | 81±13 | 42±9 | 23±5 | 53±12 | 33±11 | 23±7 | 18±2 | V | ↓↓ | | ∧ | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | | |
| | +RG | 68±8 | 31±15 | 78±21 | 32±3 | 112±27 | 73±24 | 69±21 | 28±11 | ** | | * | * | * | * | * | * | * | ** | | |
| | -RG | 157±29 | 259±45 | 150±31 | 85±21 | 101±18 | 53±21 | 58±15 | 73±11 | | | ↓↓ | ∧ | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑↑ | ↑↑↑ | | |
| PPARγ2 | +RG | 188±58 | 94±43 | 290±75 | 138±27 | 388±53 | 174±41 | 239±63 | 145±48 | ** | | * | *** | *** | * | * | *** | ** | ** | | |
| | -RG | 393±88 | 351±53 | 203±9 | 139±28 | 138±17 | 73±19 | 101±6 | 57±6 | V | ↓ | ↓↓ | | | | ↓ | | | | | |
| | +RG | 260±46 | 166±35 | 168±29 | 128±19 | 251±46 | 87±8 | 138±30 | 92±11 | ** | | * | * | * | * | * | * | * | *** | | |
| C/EBPα | -RG | 429±113 | 231±54 | 146±4 | 116±23 | 100±17 | 37±7 | 82±2 | 37±8 | V | | ↓↓ | | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | | |
| | +RG | 238±24 | 128±34 | 123±11 | 111±4 | 194±48 | 43±13 | 80±16 | 55±4 | *** | | ** | *** | *** | | ** | ** | ** | *** | | |
| | -RG | 122±32 | 66±10 | 104±24 | 65±9 | 69±11 | 26±5 | 48±6 | 29±7 | V | ↓ | ↓↓ | | | | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑↑ | | |

The data are the mean ± sem of 6 different animals and represent the mean number of mRNA transcripts per 100 cells. OE = oleoyl-estrone; RG = rosiglitazone; ↓↓ = decrease up to 60 % of controls; ↓ = decrease between 25 and 60 % of controls; ↑ = increase up to 160 % of controls; ↑↑ = increase between 160 and 300 % of controls; ↑↑↑ = increase higher than 300 % of controls; * = P lower than 0.001; ** = P lower than 0.01; *** = P lower than 0.001; three-way anova (all and site columns): V = trend to decrease, ∧ = trend to increase, two-way anovas: R = retroperitoneal, E = epididymal, M = mesenteric, S = subcutaneous columns.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1 - Body weight changes of rats treated with OE and/or RG for 10 days.

The data are the mean \pm sem of 6 different animals and are expressed as percentages of the initial (i.e. day 0) body weight. On day 10, the differences versus controls of OE and OE+RG rats were significant ($p < 0.05$), those of RG alone were not.

Figure 2 - Energy balance of rats treated with OE and/or RG for 10 days.

The data are the mean \pm sem of 6 different animals. White columns (E_i) = energy intake; black columns (E_s) = energy storage; gray columns (E_e) = energy expenditure (calculated). Left and right stacked columns amount to the same value, i.e. energy expenditure; positive energy storage (i.e. right side) represents the excess energy eaten that is stored as reserves; negative energy storage (i.e. left side), represents the contribution of internal energy stores to the maintenance of energy expenditure.

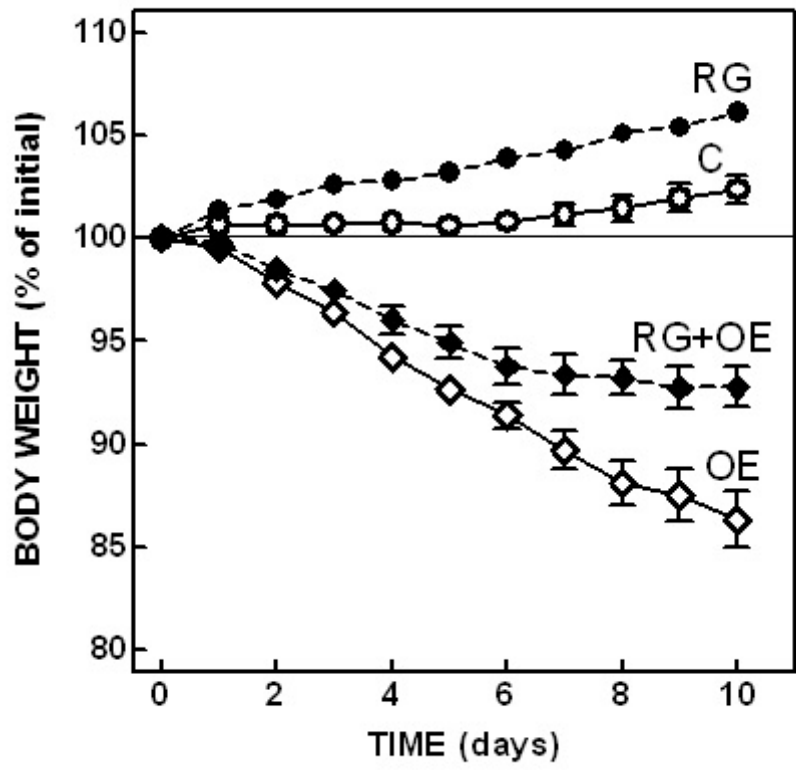


FIGURE 1

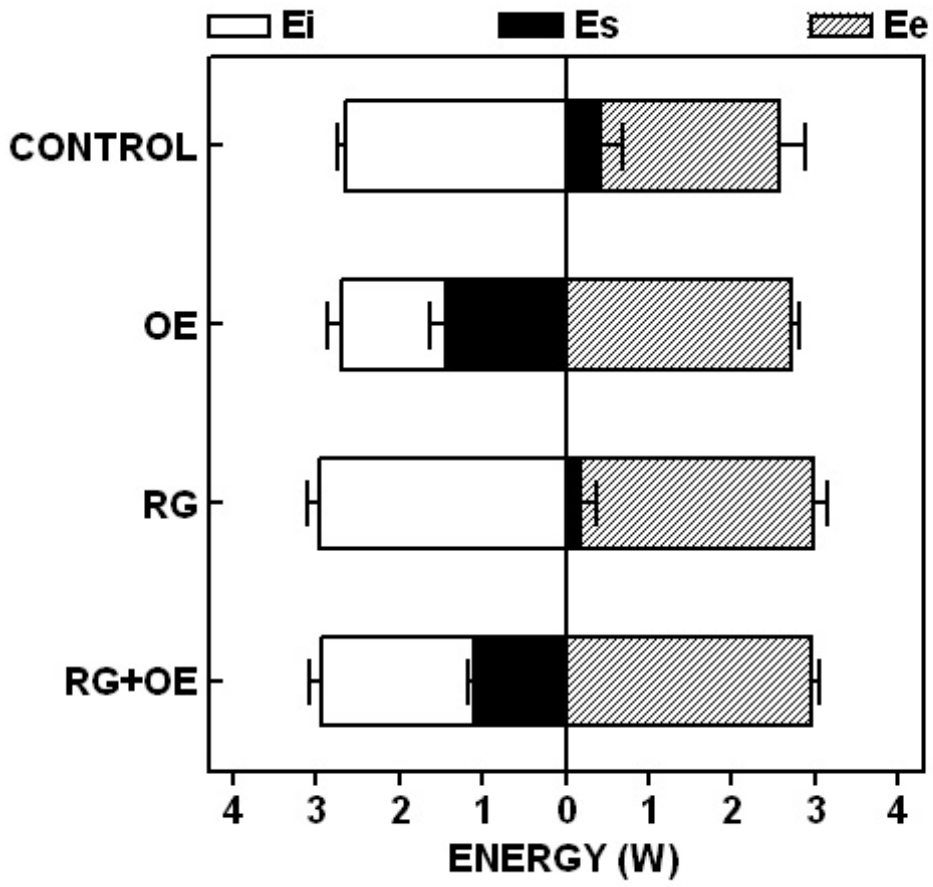


FIGURE 2

*7. Short-term oral oleoyl-estrone decreases the expression of ghrelin in the
rat stomach*

Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernández-López, Alemany M. Treball enviat a Peptides (Octubre, 2007).

SHORT-TERM ORAL OLEOYL-ESTRONE DECREASES THE EXPRESSION OF
GHRELIN IN THE RAT STOMACH

Raquel Ferrer-Lorente, José-Antonio Fernández-López, Marià Alemany, Cristina Cabot

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

AUTHOR AND ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Dr. Cristina Cabot Majem

Department of Nutrition and Food Science

Faculty of Biology, University of Barcelona

Av. Diagonal, 645; 08028 Barcelona; Spain

tel. +34 93 403 46 08; e-mail: ccabot@ub.edu

ABSTRACT

The mechanism of oleoyl-estrone (OE) modulation of appetite is unknown but partly relies on the induction of satiety, we studied the effect of OE on the expression of gut peptides affecting short-term ingestive behavior: ghrelin, leptin, CCK, PYY, and GLP-1. Adult male rats were given a single oral OE gavage, and were killed in two hours. The stomach fundus and intestine sections were dissected and processed for real-time PCR amplification. Semiquantitative estimation of gene mRNA tissue levels showed that OE markedly and rapidly decreased ghrelin expression in the stomach; leptin was unchanged; CCK mRNA decreased in the proximal intestine while PYY and GLP-1 expression was unchanged. In conclusion, short-term decrease in food intake (satiety effect) induced by OE may be essentially the consequence of a marked decrease in the expression of stomach ghrelin.

Key words: Oleoyl-estrone, food intake, short-term satiety, intestinal peptides

1. INTRODUCTION

Continuous oleoyl-estrone (OE) treatment decreases food intake while maintaining energy expenditure [22], thus creating an energy gap that is fulfilled by the mobilisation of body fat. The reduction in food intake caused by OE seems not to be mediated by changes in hypothalamic NPY or CRH [8,9]. OE affects early food intake, in the first 3 hours after its administration, OE treated rats ingested only half the food eaten by controls [10]. This rapid induction of satiety, also observed in starved rats, is not a consequence of taste-aversion effects [33]. These data hint at OE modulating the gastrointestinal signals involved in the short-term regulation of food intake.

Ghrelin is an orexigenic gut-brain peptide produced predominantly by the stomach fundus endocrine X/A-like cells [27,18]; peripheral administration of ghrelin increases food intake and GH release in humans and rodents [39,45,19]. Stomach ghrelin expression and plasma levels increase with fasting and decrease with refeeding in rats [32,25].

When the gut is loaded with nutrients, a number of satiety signals is secreted, such as cholecystokinin (CCK), produced mainly by the upper small intestine [28], peptide YY (PYY) and glucagon like-peptide 1 (GLP-1) co-localized in the endocrine L-cells, and found in higher concentrations in the distal gastrointestinal tract [5,2]. Peripheral administration of CCK, the PYY₃₋₃₆ fragment, or GLP-1 reduce food intake in humans and rodents [41,21,3,12].

Leptin has been also found to be secreted by the stomach, both by endocrine and exocrine gastric cells [14]. Stomach leptin resists proteolysis and reaches the intestine where it participates in the regulation of nutrient absorption [11,7,20]. Leptin also stimulates CCK secretion in the duodenum, and several studies point to a positive leptin-CCK synergy in the inhibition of food intake [43,24].

In the present study, we have analysed the short-term stomach and intestine response to oral OE by measuring the changes in signalling peptide expression as a way to determine whether OE-induced reduction of food intake is mediated by changes in their expression.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals and sample preparation

Adult male Wistar rats were kept under standard conditions of housing and feeding. A group of seven rats was given a single oral gavage of 10 nmol oleoyl-estrone (OE) (OED Barcelona, Spain) per g of body weight in 0.2 mL of sunflower oil at the beginning of the 12-h light cycle. The control group received the vehicle alone. Two hours later, the rats were killed and their a) stomach fundus, b) duodenum and proximal jejunum, and c) distal ileum and colon were dissected, cleaned, blotted, frozen and kept at – 80 °C.

The animals were handled and killed following a protocol approved by the University of Barcelona Animal Welfare and Ethics Committee in full compliance of the norms and procedures set forth by the European Union and the Governments of Catalonia and Spain.

2.2. cDNA obtention, real-time PCR amplification, and semiquantitative expression analysis

Tissue RNA was extracted with Tripure (Roche Applied Science, Indianapolis IN USA) and reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase (Promega, Madison, IN USA) and oligo-dT primers.

Real-time PCR amplification of the cDNAs was carried out with the reverse-transcribed RNA, specific designed primers (300nM) for ghrelin [F 5'-CACCCAGAAAGCCCAGCAGAGA-3', R 5'-CGAAGGGAGCATTG AACCTGA-3']; CCK [F 5'-CATCCAGCAGGTCCGCAA-3', R 5'-TCCATCCAGCCCATGTAGTCC-3']; GLP-1 [F 5'-CTGGTGAAAGCCGAGGAAG-3', R 5'-AGCATGTCTGCGCCCAAGT-3']; PYY [F 5'-GCGGTATGGGAAAAGAGAAGTCC-3', R 5'-GCAAGTGAAGTCGGTGTAGTTAGCA-3']; and leptin [F 5'-CGGTTCTGTGGCTTTGGT-3', R 5'-CCGACTGCGTGTGTGAAATG-3'], using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA USA). Reactions were run on an ABI PRISM 7900 HT detection system (Applied Biosystems) using a fluorescent threshold manually set to OD 0.500 for all runs. In order to determine the sensitivity and efficiency of the amplification process, PCR assay linearity ranges were previously established for each gene and tissue cDNA.

We used a semiquantitative RT-PCR expression-based analysis method [34,35] that relates the final number of bases of the transcript and the fluorescence recorded at a preset level, since there is a linear relationship between the final number of bases and the length of the transcript, an equation generated by using known cDNA probes as standards was established linking fluorescence and the initial number of copies of mRNA. Consequently we have presented the data for gene expression in femtomoles of mRNA per gram of tissue. The data obtained with these all calculations should be considered "semiquantitative" estimations. Statistical comparisons between groups was done using two-way ANOVA and the unpaired Student's t test.

3. RESULTS

The semiquantitative analysis of mRNA tissue levels for ghrelin, CCK, PYY, GLP-1 and leptin gene in the gastrointestinal tract are presented in Table 1. OE decreased ghrelin expression in stomach to less than 0.2 % of the control values. OE administration also induced a significant decrease in CCK gene expression in the upper part of the intestine. The expressions of GLP-1 and PYY were practically unchanged by OE. CCK mRNA was higher in the proximal intestine in comparison with the distal part; and, inversely, it was a predominance of PYY and GLP-1 expression in the distal intestine. Fundic leptin expression levels were not affected by OE treatment.

4. DISCUSSION

Our analysis prove that in OE-treated rats, the expression of ghrelin in the stomach was markedly reduced. The ample variability in the control group ghrelin mRNA levels contrasts with the clear reducing effects in ghrelin gene expression induced by OE; this control group variability may be a consequence of the influence of the oily vehicle, since it has been found that a high fat diet reduces ghrelin levels and its stomach expression [29]; however this interpretation may not be definitive because other authors found that a high fat diet stimulates ghrelin secretion [4] and short-term studies have observed a ghrelin mRNA decrease when refeeding with fat after a fast, but rebounds later [37].

It has been previously demonstrated that, OE effects on food intake appear early through a rapid induction of satiety. Basically in the first 3 hours after its administration OE treated rats ingested only half the food eaten by controls [10]. Furthermore, in rats fed an hiperlipidic diet OE reduces food intake already in the short-term [33]. It can be speculated that OE-induced reduction in food intake may be mediated by lowered ghrelin production, since this orexigenic peptide expression and plasma levels increase with fasting and decrease with refeeding in rats [32,25]

and ghrelin receptor-deficient rodents do not develop diet-induced obesity [46] and show reduced high-fat food intake. OE metabolic effects are both central [1,42] and peripheral [10]; however, its effects on appetite are not mediated by NPY [8] and, even at large doses, OE did not completely prevent food intake [22]. On the other side, ghrelin exerts, at least in part, its central effects on appetite through NPY/agouti-related protein coexpressing neurons, in which the ghrelin receptor has also been identified [44,13,30]. Food restriction or starvation increase ghrelin levels [15,23,25] and hypothalamic NPY synthesis [6]. It may be postulated, then, that OE action on food intake can be better defined as a reduction of increase than to inhibition; consequently its action through ghrelin may help decrease the NPY pathway activity or -more specifically- prevent its increase by other gastrointestinal or metabolic signals. In agreement with this in pair-fed animals we have seen that there is an increase in NPY expression in the hypothalamus not observed in OE treated rats (R Ferrer-Lorente, Unpublished results).

The reduced CCK expression observed in the proximal intestine of OE-treated rats is not concordant with the short-term reduction in food intake induced by OE, since CCK acts mainly as a satiety peptide [31] and its secretion stimulation is associated with an increased gastrointestinal CCK expression [28]. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin, and both ghrelin and CCK cross-inhibit their satiety/appetite effects [17,26]; in the present study, however, the expression of both peptides decreased in parallel with the reduction of food intake.

No OE effects were observed in the short-term expression on the two other anorexigenic peptides studied, GLP-1 and PYY. This may be related with the preferential absorption of the intact molecule in the upper gastrointestinal tract (stomach and jejunum) with a practically nil retention and absorption in the duodenum and large intestine [40]; two hours after OE administration, most of the compound is still in the stomach lumen. This permanence agrees with the main OE effects being exerted through the upper gastrointestinal tract: i.e. stomach ghrelin and duodenum-jejunum CCK expression. The fact that the distal intestine is the main site of GLP-1 and PYY

synthesis [5,2] may justify the absence of OE effects observed in this short-term study, but at the same time it may help rule out their possible implication in the early satiating effects of OE.

Stomach leptin is secreted after a meal by exocrine and endocrine cells, and is involved in the short-term regulation of digestion and feeding behaviour [14,24,20]. We have not observed variations in stomach leptin expression which contrasts with the known inhibition of OE on leptin expression in the adipose tissue of long-term OE-treated rats [38].

It has been demonstrated that estrogen increases ghrelin expression in the stomach, acting through the estrogen receptor α expressed in ghrelin cells [36], the clear effect of OE blocking ghrelin expression suggests that OE action is not mediated by its hydrolysis to estrone; the poor ability of the stomach to hydrolyse OE to estrone [40], also strengthens this assumption.

In conclusion, the results presented strongly suggest that the short-term decrease in food intake (satiety effect) induced by OE may be mediated, at least in part, by a marked decrease in ghrelin expression in the stomach, rather than to an increase of the main anorexigenic signals from the intestine (i.e. CCK, PYY, and GLP-1). The fact that OE is mostly absorbed intact by the stomach gives support to this hypothesis.

REFERENCES

- [1] Adan C, Cabot C, Vilà R, Grasa MM, Masanés RM, Esteve M et al. Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *Int J Obes* 1999;23:366-73.
- [2] Anini Y, Fu-Cheng X, Cuber JC, Kervran A, Chariot J, Rozé C. Comparison of the postprandial release of peptide YY and proglucagon-derived peptides in the rat. *Pflügers Arch: Eur J Physiol* 1999;438:299-306.

[3] Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL et al. Gut hormone PYY physiologically inhibits food intake. *Nature* 2002;418:650-4.

[4] Beck B, Musse N, Stricker-Krongrad A.. Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in Long-Evans rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:1031-5.

[5] Böttcher G, Sjölund K, Eckblad E, Hakanson R, Swartz TW, Sundler F. Coexistence of peptide YY and glicentin immunoreactivity in endocrine cells of the gut. *Regul Pept* 1984;8:261-6.

[6] Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 1990; 52:441-7.

[7] Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, Tsocas A, Voisin T, Péranski G et al. PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalexin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest* 2001;108:1483-94.

[8] Cabot C, Grasa MM, Adán C, Pérez-Clausell J, Virgili J, Estruch J et al. Oleoil-Estrone does not alter hypothalamic Neuropeptide Y in Zucker lean and obese rats. *Peptides* 1998;19:1631-35.

[9] Cabot C, Grasa MM, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M et al. Zucker obese rats are insensitive to the CRH-increasing effect of Oleoil-estrone. *Brain Res Bull* 1998;46:526-34.

[10] Cabot C, Salas A, Ferrer-Lorente R, Savall P, Remesar X, Fernández-López JA et al. Short-term oral oleoil-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *Int J Obes* 2005;29:534-9.

[11] Cammisotto PG, Gingras D, Renaud C, Levy E, Bendayan M. Secretion of soluble leptin receptors by exocrine and endocrine cells of the gastric mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:242-9.

[12] Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD. Intravenous infusion of glucagon-like peptide-1 inhibits food intake, sham feeding, and gastric emptying in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1695-706.

[13] Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Fraizer ZS et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 2004;145:2607-12.

[14] Cinti S, De Matteis R, Picó C, Ceresi E, Obrador A, Maffei C et al. Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes* 2000;24: 789-93.

[15] Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New Engl J Med* 2002;346: 1623-30.

[16] Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141:4255-61.

[17] Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T et al. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology* 2005;146:3518-25.

[18] Dornonville de la Cour C, Björkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao C-M, Chen D et al. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001;99:141-50.

[19] Druce MR, Wren AM, Park AJ, Milton JE, Patterson M, Frost G et al. Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int J Obes* 2005;29:1130-6.

[20] Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, Devaud H, Buyse M, Bado A. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes* 2005;54:348-5.

[21] Geary N, Kissileff HR, Pi-sunyer FX, Hinton V. Individual, but not simultaneous, glucagon and cholecystokinin infusions inhibit feeding in men. *Am J Physiol* 1992;262:R975-80.

[22] Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay MT et al. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces dose-dependent loss of fat in wistar rats. *Obes Res* 2001;9:202-9.

[23] Gualillo O, Caminos JE, Nogueiras R, Seoane LM, Arvat E, Ghigo E et al. Effect of food restriction on ghrelin in normal cycling female rats and in pregnancy. *Obes Res* 2002;10:682-7.

[24] Guilmeau S, Buyse M, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A. Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion, evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. *Diabetes* 2003;52:1664-72.

[25] Kim MS, Yoon CY, Park KH, Shin CS, Park KS, Kim SY et al. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroendocrinology* 2003;14:1317-20.

[26] Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae HG, Andresen V et al. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Reg Int Comp Physiol* 2005;288:R751-8.

[27] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-60.

[28] Liddle RA, Carter JD, McDonald AR. Dietary regulation of rat intestinal cholecystokinin gene expression. *J Clin Invest* 1988;81:2015-9.

[29] Moesgaard S, Ahrén B, Carr RD, Gram DX, Brand CL, Sundler F. Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expression in the mouse stomach. *Regul Pept* 2004;120:261-7.

[30] Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Tsuruta T, Kangawa K et al. Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regul Pept* 2005;126:55-9.

- [31] Moran TH. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 2000;16:858-6.
- [32] Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, Nakahara K, Ida T, Mondal MS. Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol* 2002;174:283-8.
- [33] Remesar X, Guijarro P, Torregrosa C, Grasa MM, López J, Fernández-López JA et al. Oral oleoyl-estrone induces the rapid loss of body fat in Zucker lean rats fed a hyperlipidic diet. *Int J Obes* 2000;24:1405-12.
- [34] Romero MM, Grasa MM, Fernández-López JA, Esteve M, Alemany M. Semiquantitative RT-PCR measurement of gene expression in rat tissues including a correction for varying cell size and number. *Nutr Metab* 2007 (in press)
- [35] Rutledge RG & Côte C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e93.
- [36] Sakata I, Tanaka T, Yamazaki M, Tanizaki T, Zheng Z, Sakai T. Gastric estrogen directly induces ghrelin expression and production in the rat stomach. *J Endocrinol* 2006;190:749-57.
- [37] Sánchez J, Oliver P, Palou A, Picó C. The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology* 2004;45:5049-55.

[38] Sanchis D, Adán C, Ardévol A, Grasa MM, Cabot C, Balada F et al. Short-term treatment with Oleoil-estrone in liposomes (Merlín-2) strongly reduces the expresión of the ob gene in young rats. *Biochem J* 1997;326:357-60.

[39] Seoane LM, Tovar S, Baldelli R, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF et al. Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *Eur J Endocrinol* 2000;143:R7-9.

[40] Serrano-Muñoz M, Grasa MM, González-Martínez D, Cabot C, Fernández-López JA, Alemany M. Intestinal oleoil-estrone esterase activity in the Wistar rat. *J Endocrinol Invest* (in press)

[41] Smith GP, Gibbs J, Jerome C, Pi-Sunyer FX, Kissileff HR, Thornton J. The satiety effect of cholecystokinin: a progress report. *Peptides* 1981;2:57-9.

[42] Vasselli JR, Currie PJ, Lukic T, Harris AG. Centrally-injected oleoyl-estrone reduces feeding and body weight in rats. *Diabetologia* 2007;50(Suppl 1):S22. Abstract 0039.

[43] Wang L, Barrachina MD, Martínez V, Wei JY, Taché Y. Synergistic interaction between CCK and leptin to regulate food intake. *Regul Pept* 2000;92:79-85.

[44] Wang L, Saint-Pierre DH, Taché Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002;325:47-51.

[45] Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA et al. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 2001;50:2540-7.

[46] Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE et al. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005;115:3564-72.

V. DISCUSSIÓ GENERAL

La finalitat d'aquest treball ha estat continuar caracteritzant els efectes aprimadors de l'oleoïl-estrona aprofundint en el coneixement del seu mecanisme d'acció, i de com els seus efectes sobre la ingesta, la composició corporal i la millora a la resistència a la insulina, poden ser modulats al ser combinada amb altres fàrmacs, comprovant especialment la seguretat d'aquestes combinacions.

Just abans del descobriment de l'oleoïl-estrona, el nostre grup havia centrat el seu interès en l'estrona com a possible senyal de ponderostat, però va ser ràpidament descartada en veure que aquesta tenia efectes clarament anabòlics afavorint la deposició de greix (Lobo et al., 1993). Tot i la clara diferència d'efectes metabòlics existents entre l'estrona i l'OE (Grasa et al., 2001a; Remesar et al., 1999; Sanchis et al., 1996), encara existia la possibilitat de que l'OE pogués dur a terme els seus efectes a través de la possible estrona lliure (o un derivat d'aquesta, com l'estradiol) derivada de la seva metabolització suggerint la possibilitat que l'oleoïl-estrona simplement actués com un "transportador d'estrògens". Així, per tal de caracteritzar els efectes metabòlics de l'estrona i confirmar les diferències entre els dos compostos s'ha administrat als animals un ampli rang de dosis d'estrona per via oral.

Els resultats obtinguts mostren un efecte bifàsic de l'estrona sobre la massa corporal. Dosis diàries d'estrona en un rang entre 10 i 100 nmol/kg incrementen marcadament el pes corporal degut a un increment del contingut d'aigua, proteïna i lípids, mentre que dosis molt més elevades redueixen el pes corporal afectant el contingut hídric, proteic i lipídic dels animals. L'anàlisi del balanç energètic d'aquestes rates revela de nou aquesta resposta bifàsica a les dosis d'estrona, seguint el mateix patró observat en el contingut lipídic i pes dels animals. Les baixes dosis d'estrona incrementen la ingesta energètica amb un manteniment de la despesa energètica, que, per tant, es reflecteix en un augment de l'energia emmagatzemada. Una dosi d'estrona de 100 nmol/kg.dia provoca una marcada disminució de la despesa energètica que, malgrat la reducció de la ingesta, provoca un màxim en l'energia acumulada. A partir d'aquí, dosis més elevades d'estrona redueixen progressivament l'energia ingerida mantenint la despesa energètica constant però per sota dels controls, donant lloc a una reducció progressiva de l'energia emmagatzemada. Els animals que han rebut dosis d'estrona per sobre dels 100 nmol/kg.dia presenten un increment dels nivells plasmàtics d'acil-estrona, el que suggereix una possible conversió de l'estrona a oleoïl-estrona, de manera que aquesta seria la responsable de la pèrdua de pes associada a aquestes dosis. Aquesta hipòtesi estaria d'acord amb el model de ponderostat postulat pel nostre grup (Adan et al., 1999a), amb una resposta bifàsica al tractament amb oleoïl-estrona en funció de la dosi (Grasa et al., 2001a) i que depèn de la relació d'equilibri oleoïl-estrona/estrona.

La possibilitat que l'oleoïl-estrona pogués dur a terme els seus efectes a través dels receptors propis dels estrògens és un tema de seguretat que ha preocupat al nostre grup durant molt de temps. En estudis anteriors vam palesar la nul·la afinitat de l'oleoïl-estrona pel

receptor d'estrògens α i l'absència d'efectes estrogènics del tractament oral amb OE (Cabot et al., 2001b). Tot i així, es va considerar que l'administració conjunta de l'oleoil-estrona amb tamoxifè, un dels antagonistes dels receptors d'estrògens més àmpliament utilitzats, podria ser una bona manera de confirmar els resultats anteriors.

L'administració de tamoxifè no evita els efectes sobre la mobilització de greixos de l'oleoil-estrona, la qual cosa indica que el bloqueig dels receptors d'estrògens no impedeix l'acció de l'OE. No obstant això, el tamoxifè per si sol indueix una significativa, encara que més petita, pèrdua de greix i una disminució de la ingesta semblant a l'observada en els animals tractats únicament amb OE. Aquests efectes no són additius, de manera que la combinació de tots dos compostos no té efectes addicionals sobre la pèrdua de greix. Fins i tot, s'observa una disminució de la mobilització de greixos en el grup tractat conjuntament amb oleoil-estrona i tamoxifè, que podria ser conseqüència de la reducció en la despesa energètica induïda pel tamoxifè i present en la combinació d'aquest amb l'OE.

Els efectes oposats de l'estrona i l'oleoil-estrona sobre el balanç energètic descarten definitivament l'estrona com a mediador dels efectes de l'OE. En canvi, l'estradiol que es podria derivar de l'OE, del que és coneguda la seva capacitat en mobilitzar els greixos i reduir la gana (Anderson et al., 2001; Thompson i Cox, 1979), no pot ser totalment descartat amb els resultats obtinguts. Malgrat tot, la falta d'efectes de l'oleoil-estrona sobre el pes dels ovaris i de l'úter i el desenvolupament de la glàndula mamària (Cabot et al., 2001b), així com el limitat efecte de l'OE sobre els nivells d'estradiol (Cabot et al., 2001b) i la inhibició de l'OE de la $17\beta\text{OH-5DH}$, que converteix l'estrona en estradiol, ens permeten descartar també l'estradiol com a mediador dels efectes de l'OE.

L'estudi realitzat mostra la complexa relació entre l'oleoil-estrona i els estrògens. Per una banda els efectes del tamoxifè semblen estar d'acord amb una possible acció com agonista més que com antagonista dels receptors d'estrògens; o fins i tot de l'existència d'una via alternativa d'actuació del tamoxifè (Colleta et al., 1994). Així que, podríem esperar que si les accions de l'OE són mitjançades per l'estradiol generat (és a dir, actuant com agonista), en la combinació amb el tamoxifè (actuant també com agonista) s'haurien d'observar uns efectes additius per la més marcada estimulació dels receptors d'estrògens, i aquest no és el cas. Per altra banda, si assumim la hipòtesi de partida, en la què el tamoxifè actua bloquejant els receptors d'estrogen, el fet que els efectes de l'oleoil-estrona sobre la ingesta i la mobilització lipídica no es trobin disminuïts per la presència del tamoxifè evidencia que els efectes metabòlics de l'OE no són mediatos a través de la seva unió directa als receptors d'estrogen, ni per la seva conversió a estrona o altre estrogen que actui unint-se a aquests receptors, confirmant així l'acció de l'OE per una via no estrogènica. Tot i així, les dades obtingudes no ens permeten descartar totalment una possible interacció de l'oleoil-estrona amb els receptors d'estrogen, pel que seria

convenient la realització de més estudis en combinació amb altres bloquejants dels receptors d'estrògens més específics que el tamoxifè per tancar definitivament aquest plantejament.

Com ja s'ha comentat en capítols anteriors, actualment són molts els estudis que aposten per l'aplicació d'una teràpia farmacològica combinada com una nova estratègia per al tractament de l'obesitat per tal de contrarestar els mecanismes compensatoris activats davant d'una alteració de les reserves de greix en l'organisme i en defensa d'un pes establert. Aquestes combinacions han de garantir un augment de l'eficiència, afavorint unes pèrdues de pes més significatives que la dels dos fàrmacs per separat, a l'hora que garantir la seguretat de la combinació per tal d'evitar casos dramàtics com els de l'associació de la fentermina amb la dexfenfluramina que va acabar amb la retirada d'aquesta última del mercat (Rich et al., 2003; Sachdev et al., 2002).

Seguint aquest fonament, la combinació de l'oleoïl-estrona amb agents aprimadors com la dexfenfluramina, la sibutramina, la fentermina, el CL316,243 i el rimonabant ens ha permès determinar si aquests comparteixen un mecanisme d'acció comú amb l'OE, a l'hora que analitzar preliminarment la seguretat de la seva combinació en el cas de ser aplicada com una teràpia combinada per al tractament de l'obesitat. La realització d'aquests experiments requeria d'un model d'animals amb sobrepès comparable al sobrepès dels humans, el qual es va establir alimentant *ad libitum* rates mascle amb una dieta de cafeteria durant 5 setmanes, aconseguint una proporció inicial de lípids entre un 15 i 18%, comparable amb la que presenta un home adult –no obès– amb sobrepès.

La combinació de l'oleoïl-estrona amb la sibutramina, un inhibidor de la recaptació de serotonina i noradrenalina, i un dels pocs fàrmacs actualment autoritzats pel tractament de l'obesitat, mostra un efecte additiu que indueix una pèrdua de lípid més marcada que l'obtinguda amb cadascun dels fàrmacs per separat. El fet que aquesta pèrdua de greix, aconseguida en un tractament de 10 dies i sense restricció alimentària, representi més d'una quarta part del seu percentatge lipídic inicial suggereix que la combinació dels dos agents pot facilitar una ràpida pèrdua de l'excés de greix. La combinació de l'OE amb la sibutramina indueix efectes additius sobre la reducció de la ingesta i, conseqüentment, efectes additius sobre les pèrdues energètiques derivades de les reserves corporals, associats al manteniment de la despesa energètica. Aquesta pèrdua energètica deriva en gran part de les reserves lipídiques, sense que els canvis observats en altres components energètics siguin estadísticament significatius. Aquestes observacions concorden amb els potents efectes mobilitzadors de greixos, conservant la proteïna corporal, de l'OE (Grasa et al., 2001a) i amb la pèrdua de lípids observada en els tractaments amb la sibutramina (Van Gaal et al., 1998). Els efectes additius entre els dos fàrmacs semblen encoratjadors, ja que l'OE, amb la seva capacitat de reajustament del ponderostat (Adán et al., 1999a), podria evitar la ràpida recuperació del pes perdut en el tractament amb sibutramina, la qual s'ha vist que no té la

capacitat de mantenir la pèrdua de pes, a no ser que el tractament sigui combinat amb una limitació de la ingesta energètica (James et al., 2000).

La combinació de l'oleoil-estrona amb la dexfenfluramina, un altre inhibidor de la recaptació de serotonina, mostra uns efectes additius comparables als observats en la combinació de l'OE amb la sibutramina. S'observa un efecte additiu sobre la pèrdua de pes, així com de la mobilització del greix corporal, reflex d'una disminució de la ingesta i del manteniment de la despesa energètica. El manteniment de la glucèmia, la millora en els nivells circulants de colesterol i triacilglicerols, i de l'índex HOMA, indicador de la resistència a la insulina, així com la no alteració de les transaminases, suggereix que, almenys en el curt període de temps estudiat, la combinació dels dos fàrmacs no produeix alteracions metabòliques perjudicials.

Així, els efectes additius en la reducció de la ingesta en la combinació de l'OE amb aquests dos agents inhibidors de la recaptació de serotonina, sibutramina i dexfenfluramina, apunten a que l'OE no actua a través de la via de la serotonina per a reduir la ingestió d'aliment.

Els efectes additius observats entre l'oleoil-estrona i els inhibidors de la recaptació de serotonina, sibutramina i dexfenfluramina, no s'han observat en la combinació de l'OE amb la fentermina, probablement perquè aquest és un fàrmac que per si mateix indueix molt pocs canvis en les reserves lipídiques (Mancini, 2003), sent normalment utilitzat en conjunció amb altres agents antiobesitat (Wellman i Maher, 1999). En els animals tractats únicament amb la fentermina no s'observa una reducció de la ingesta, malgrat les seves característiques simpatomimètiques i el seu conegut efecte inhibidor sobre la MAO perllongant l'acció de la serotonina (Maher et al., 1999; Ulus et al., 2000). Tampoc observem en aquests animals un augment de la despesa energètica encara que la fentermina és un agent que incrementa la disponibilitat de noradrenalina activant centralment la termogènesi (Zychlinski i Montgomery, 1984). Els efectes observats en el grup en el que es combina l'oleoil-estrona amb la fentermina són gairebé idèntics als del grup en el que s'ha administrat únicament l'OE, no trobant efectes de potenciació en la mobilització de les reserves.

Malgrat que, tant la fentermina, activant l'alliberament i inhibint la recaptació de noradrenalina (Samanin and Garattini, 1993), com la sibutramina, la que a més d'inhibir la recaptació de la serotonina, inhibeix la recaptació de noradrenalina (Heal et al., 1998), estan descrits a més de com fàrmacs anorèctics com agents simpatomimètics amb un efecte d'activació central de la termogènesi (Arch, 1981; Hansen et al, 1999), en el nostre estudi no s'observa un augment de la despesa energètica en les rates tractades amb fentermina o sibutramina, únicament veiem un manteniment d'aquesta tal i com succeeix en les rates tractades amb OE. Aquests resultats, per tant, no ens permeten discriminar les possibles interaccions del mecanisme d'acció de l'OE amb l'activació simpàtica central.

Posteriorment, i seguint el concepte d'associació entre fàrmacs d'actuació sobre els diferents components de l'equació de l'equilibri energètic que afavoriria encara més la pèrdua de les

reserves en l'organisme (Fernández-López et al., 2002), s'ha combinat l'oleoil-estrona amb el CL316,243, un agonista dels receptors β_3 -adrenèrgics (Susulic et al., 1995). La combinació de l'oleoil-estrona amb el CL-316,243 provoca un potent efecte sinèrgic sobre la mobilització de les reserves lipídiques, fruit de l'increment de la despesa energètica i potenciació de la lipòlisi que provoca l'agonista dels receptors β_3 -adrenèrgics i de la reducció de la ingesta induïda per l'OE. En els 10 dies de tractament, el grup de rates que reben la combinació dels dos fàrmacs perden més d'una tercera part de l'energia emmagatzemada resultat de la marcada pèrdua de greix. En el cas de l'agonista β_3 -adrenèrgic, aquesta massiva mobilització lipídica és deguda, en gran part, a l'estimulació directa de la lipòlisi (Atgie et al., 1997; Carpéné et al., 1998) subministrant lípids com a combustible per a la termogènesi (Atgié et al., 1997; Himms-Hagen et al., 1994). L'OE, per la seva part, promou l'apoptosi dels adipòcits (Remesar et al., 2002; Salas et al., 2007) i manté l'homeòstasi energètica i glucídica (Grasa et al., 2001a) incrementant la sensibilitat a la insulina (Grasa et al., 2001b), processos que faciliten la disponibilitat selectiva del greix emmagatzemat. El CL316,243 també augmenta la disponibilitat de glucosa (de Souza et al., 1997) encara que la mobilització lipídica causada per l'OE proporciona energia suficient pel manteniment de l'activitat metabòlica i la funció muscular sota una disponibilitat energètica limitada (Blay et al., 2002), mantenint els nivells de glucosa i preservant la proteïna corporal (Sanchis et al., 1997b). En tots els grups tractats amb el CL316,243 s'ha observat una disminució significativa dels nivells circulants de glucosa, el que pot indicar que el manteniment de la glucosa induït per l'OE en aquest cas no és prou efectiu per a compensar totalment l'augment de la utilització de glucosa propiciat per l'agonista adrenèrgic. Aquests resultats suggereixen que la combinació de l'oleoil-estrona amb un agonista específic dels receptors β_3 -adrenèrgics, com el CL-316,243, podria compensar la curta durada dels efectes de l'agonista (Fève et al., 1992; Onai et al., 1995), però també potenciar els efectes en la mobilització lipídica induïda per l'OE, mostrant-se com una alternativa ràpida i efectiva que val la pena continuar explorant per al tractament de l'obesitat.

El rimonabant, un antagonista dels receptors dels cannabinoides CB_1 , també ha estat objecte d'estudi en combinació amb l'oleoil-estrona. No s'han trobat efectes combinats significatius, en part perquè els efectes del rimonabant estan limitats als primers dies de l'estudi, fet que sorprèn d'un fàrmac que actualment es troba a les portes de la seva comercialització pel tractament de l'obesitat. El rimonabant presenta un efecte molt ràpid sobre la gana i de poca durada d'acord amb l'observat en estudis previs (McLaughlin et al., 2003), i els seus efectes sobre les reserves lipídiques i sobre la distribució de greix en el TAB són molt limitats, especialment si els comparem amb els efectes de l'OE, almenys en aquest model de sobrepès. Així, els efectes observats sobre la ingesta i la composició corporal en els animals tractats amb la combinació dels dos fàrmacs són pràcticament idèntics als observats en els animals en els que únicament s'ha administrat l'oleoil-estrona; en aquests últims, fins i tot, la pèrdua de pes observada és més gran que en la combinació. Curiosament, en analitzar el pes dels diferents

teixits adiposos per separat si que observem una disminució més gran en el tractament combinat respecte la produïda per cada un dels fàrmacs per separat, i que no es veu reflectida en l'anàlisi del contingut lipídic total. Aquest fet, ens podria estar indicant que l'oleoil-estrona indueix la pèrdua del greix en localitzacions extradiposes, com ara el múscul i el fetge; reservoris grassos sobre els que el rimonabant no té cap efecte. Aquesta utilització del greix intramuscular per part de l'oleoil-estrona podria ser un dels mecanismes pels quals l'OE contribueix a millorar la resistència a la insulina. L'OE fa decreixer els nivells circulants de colesterol i triacilglicerols, mentre que el rimonabant sí que disminueix els nivells de triacilglicerols, però, tendeix a incrementar els de colesterol, suggerint que l'OE (Blay et al., 2002; Cabot et al., 2005) i el rimonabant (Després et al., 2005; Poirier et al., 2005) no coincideixen en la via utilitzada per millorar la lipidèmia. Aquests resultats poden estar relacionats amb el conegut efecte del rimonabant incrementant la fracció de colesterol-HDL en els humans (Poirier et al., 2005; van Gaal et al., 2005).

Així, la diferència en els efectes sobre la ingesta, la lipidèmia i la mobilització de lípids entre el rimonabant i l'OE podria ser un indicatiu de que l'OE no actua a través de les vies cannabínèrgiques. Per altra banda, la manca d'efectes additius o de potenciació de la pèrdua de pes entre els dos fàrmacs no ens dóna motius per considerar l'administració conjunta de l'oleoil-estrona i el rimonabant com una bona alternativa per al tractament de l'obesitat.

Aquesta sèrie d'experiments ens han ajudat a conèixer de forma preliminar el que podríem esperar des d'un punt de vista de seguretat en la combinació de l'oleoil-estrona amb altres fàrmacs antiobesitat; no observant, en general, efectes sobre indicadors d'alteracions metabòliques com ara les transaminases; o en l'aspecte i comportament dels animals, entre d'altres paràmetres. A més, possiblement són una prova de que l'OE no actua a través de la mateixa via que els inhibidors de la recaptació de serotonina dexfenfluramina i sibutramina, ni com antagonista dels receptors de cannabínoids CB1 com ho fa el rimonabant, ni compartint via amb l'activador de la termogènesi CL316,243. Així, el mecanisme d'acció de l'oleoil-estrona sembla ser diferent al de tots aquests fàrmacs, tenint present la possibilitat d'efectes additius en el cas de la dexfenfluramina i la sibutramina, i d'efectes sinèrgics amb l'agonista dels receptors β_3 adrenèrgics CL316,243, que farien possible la seva aplicació com una teràpia farmacològica combinada segura i eficaç per al tractament de l'obesitat. Caldria, llavors, la realització d'estudis addicionals per tal d'explorar amb més detall i a diferents dosis la seguretat i els efectes d'aquestes combinacions a mig i llarg termini, sobre tot en el cas de la sibutramina i el CL316,243, on els resultats han estat més encoratjadors.

Tal i com esperàvem, mentre que l'oleoil-estrona indueix una marcada pèrdua de les reserves lipídiques dels animals tractats, conseqüència del buit energètic resultat de la reducció de la ingesta i el manteniment de la despesa energètica (Sanchis et al., 1997b); la rosiglitazona

provoca un increment de pes, resultat d'un increment en la ingesta dels animals tractats (Carey et al., 2002), i redueix la pèrdua de pes induïda per l'OE quan són administrats conjuntament.

Encara que, l'anàlisi del contingut lipídic i cel·lularitat de les quatre localitzacions adiposes estudiades ens mostra com l'OE en general tendeix a induir una disminució de la massa i contingut lipídic cel·lular en paral·lel amb la reducció de la massa i del % de lípids total dels teixits; els resultats obtinguts, com ja s'ha observat en els estudis de combinació de l'OE amb el rimonabant, insinuen que part de les pèrdues lipídiques induïdes per l'oleoil-estrona no corresponen als dipòsits adiposos analitzats, el que podria estar indicant, novament, una mobilització lipídica de reserves de greix extradiposes. Aquesta acció pot ser clau en la millora de la sensibilitat a la insulina induïda per l'OE, ja que existeix una estreta relació entre l'acumulació lipídica al múscul i la resistència a la insulina (Pan et al, 1997; Turner et al., 2007).

L'anàlisi dels paràmetres plasmàtics ens ha permès confirmar un cop més l'efecte beneficiós de l'OE sobre els nivells de colesterol plasmàtic, millorant la lleugera hipercolesterolèmia provocada per la rosiglitazona. Per una altra banda, la reducció significativa dels nivells plasmàtics de ghrelina per part de l'OE compensant la pujada provocada per la rosiglitazona, ens confirmaria la possible acció de l'OE a través de la ghrelina per tal d'augmentar la sensació de sadollament i reduir així la ingesta.

En general, tot i que s'observen diferències entre les diferents localitzacions adiposes analitzades, els efectes de l'OE i la rosiglitazona sobre l'expressió dels principals indicadors i reguladors del metabolisme energètic són gairebé oposats; mentre que l'oleoil-estrona induïx una depressió generalitzada de l'expressió d'aquests, la rosiglitazona la incrementa. Així, observem que el tractament amb OE induïx una marcada depressió de l'activitat metabòlica del teixit adipós; disminuint la capacitat de captació de glucosa, amb la disminució de l'expressió del GLUT 4, i inhibint la nova síntesi d'àcids grassos, amb la inhibició de l'expressió d'enzims clau de la via lipogènica com l'acetil-CoA carboxilasa (ACC) i l'àcid gras sintasa (FAS), el bloqueig dels quals ha estat proposat en diverses ocasions com a possible teràpia per combatre l'obesitat i la síndrome metabòlica (Harwood, 2004; Kusunoki et al., 2006). En el mateix sentit, i potenciant aquest efecte de bloqueig lipogènic, observem com l'OE inhibeix l'expressió d'un dels principals controladors de les vies lipogèniques, el SREBP1c (Shimano et al., 1999) i de l'adiponutrina, un altre indicador de l'anabolisme lipídic (Liu et al., 2004). Aquesta situació podria estar afavorint la utilització dels greixos emmagatzemats com a font d'energia per al propi teixit, que sumat a la inhibició de la incorporació de lípids fruit de la disminució de l'expressió de la lipoproteïna lipasa (LPL), explicaria la forta reducció de les reserves lipídiques de les rates tractades amb OE. La rosiglitazona, en canvi, promou l'adipogènesi incrementant l'expressió tant d'indicadors com d'enzims lipogènics. Així, i contràriament a l'OE, observem un augment en l'expressió de l'ACC, la FAS, l'adiponutrina i el SREBP1c, i una activació de l'entrada de glucosa (increment en l'expressió de GLUT 4) i de la incorporació de lípids provinents de les lipoproteïnes (augment de la LPL). Davant d'aquesta

marcada activació lipogènica, la rosiglitazona, a la vegada, incrementa l'expressió de la lipasa sensible a hormones (HSL) i, en especial, de la carnitina palmitoïl-transferasa 1b (CPT1b) responsable de la incorporació de l'Acil-CoA a la mitocondria per a seva completa oxidació (McGarry et al, 1989); possiblement en resposta a la massiva aportació de fonts d'energia.

Els efectes de l'OE i la rosiglitazona sobre l'expressió dels factors de transcripció C/EBP α i C/EBP β , estimuladors adipogènics (Rangwala i Lazar, 2000), ens marca la diferència existent en els seus mecanismes d'acció: la rosiglitazona no provoca canvis en la seva expressió, mentre que l'OE indueix una disminució generalitzada de l'expressió dels dos factors de transcripció, indicant una inhibició de l'adipogènesi per part de l'OE, que unida a la seva acció activadora de l'apoptosi (Remesar et al., 2002; Salas et al., 2007) i de reducció de la mida cel·lular dels adipòcits (Cabot et al., 2000) explicaria la reducció del pes en els dipòsits de greix.

A més de la inhibició de la captació de glucosa, de la LPL i de la lipogènesi, l'OE en paral·lel disminueix l'expressió del receptor β 1 adrenèrgic, l'adiponectina i la leptina. Aquesta acció de l'OE resulta aparentment contradictòria ja que l'increment de la senyalització adrenèrgica és un element clau en la mobilització de greixos (Okuda et al., 1996), la secreció d'adiponectina disminueix la resistència a la insulina (Whitehead et al., 2006) i la leptina disminueix la gana i estimula la mobilització de greixos a través del control hipotalàmic (Schwartz et al., 2000), tots ells efectes característics en l'administració d'OE (Adán et al., 1999a; Grasa et al., 2001a; Vasselli et al., 2007). Aquest fet ens podria estar indicant que l'OE actua a través de vies independents a aquests (receptor β 1 adrenèrgic, adiponectina i leptina), ja que malgrat el descens de la seva expressió continuem observant aquests efectes en els animals tractats amb l'oleoïl-estrona. Fins i tot, podríem postular una actuació de l'OE en altres punts d'aquestes vies de senyalització; com ara la inhibició observada sobre l'expressió de la fosfodiesterasa 3B (PDE 3B), enzim responsable de la degradació de l'AMPc (principal activador de la PKA) i punt de regulació clau de la lipòlisi (Holm, 2003), que també faria incrementar la mobilització de greixos malgrat la disminució de l'expressió del receptor β 1 adrenèrgic; o una actuació de l'OE en nivells superiors de les vies d'acció d'aquests agents reguladors, fent que un augment sobtat d'OE pugui provocar una depressió generalitzada de vies paral·leles, o d'actuació posterior, com succeeix en el cas de la leptina (Adán et al, 1999a).

Al contrari del que podríem esperar davant d'un tractament continu amb un agonista dels PPAR γ (Takamura et al, 2001), la rosiglitazona no indueix la retroinhibició d'aquests receptors resultat de l'exposició continuada, trobant així, una esperada activació de les vies lipogèniques i una reversió dels efectes inhibidors de l'OE sobre l'expressió dels PPAR γ . Aquest patró oposat sobre l'expressió d'aquests receptors entre la rosiglitazona i l'OE, sumat als efectes combinats sobre els canvis de pes i de contingut lipídic observats quan tots dos agents són administrats conjuntament suggereixen que la rosiglitazona i l'OE poden actuar, almenys en part, a través de la mateixa via però en sentit oposat.

Així, i malgrat els seus efectes globals profundament diferents sobre el metabolisme energètic, l'OE i la rosiglitazona aconsegueixen una reducció efectiva de la resistència a la insulina mantenint els nivells de glucosa. L'administració conjunta de l'oleoïl-estrona amb la rosiglitazona permet una correcció per part de l'OE de l'acumulació de greix derivada de l'ús de les tiazolidinones. Així, el tractament combinat de oleoïl-estrona i la rosiglitazona pot ser positiu per al pacient diabètic de tipus 2 que a més presenta obesitat o sobrepès o que presenta una marcada predisposició a l'acumulació de greixos.

L'efecte additiu de l'oleoïl-estrona sobre la ingesta vist en els experiments de combinació indica que la regulació sobre la gana no es realitza a través de la modulació de les vies serotoninèrgiques, ni a través de les vies cannabinèrgiques si ens fixem en la diferència dels efectes sobre la ingesta, la lipidèmia i la mobilització de lípids entre el rimonabant i l'OE. Tampoc ho fa a través de la modulació del NPY (Cabot et al., 1998a) ni de la CRH (Cabot et al., 1998b). S'ha postulat que el manteniment de la glucèmia propiciat pel tractament amb l'OE pot ser un factor decisiu en la disminució de la ingesta ja que s'ha vist que en estat de normoglicèmia un augment de la sensibilitat a la glucosa, com s'observa amb l'oleoïl-estrona, inhibeix la ingesta (Mayer, 1953). Aquesta seria una possible explicació a la disminució de la ingesta causada per l'OE a llarg termini. Més a curt termini, podríem pensar que l'OE no actua eliminant la sensació de gana, sinó que actua a través d'una ràpida inducció de la sensació de sadollament. Aquesta suposició, recolzada per la ràpida aparició dels efectes de l'oleoïl-estrona sobre la ingesta, els quals no són conseqüència de fenòmens d'aversion (Remesar et al., 2000), fa pensar en una possible modulació dels principals senyals gastrointestinals reguladors de la ingesta a curt termini per part de l'OE.

Per tal de confirmar aquesta hipòtesi s'han analitzat els efectes de l'oleoïl-estrona en l'expressió dels diferents pèptids gastrointestinals reguladors de la conducta alimentària a curt termini: la ghrelina, la leptina, i els principals senyals inductors de sadollament CCK, PYY i GLP-1.

El tractament oral amb OE provoca una marcada i ràpida inhibició de l'expressió de ghrelina a l'estómac. Aquesta dada, juntament amb el fet de que el tractament amb oleoïl-estrona redueix la ingesta ja en un curt termini de temps (a les 2 hores) en rates alimentades amb dieta hiperlipídica (Remesar et al., 2000) i que els rosegadors amb una deficiència en el receptor de la ghrelina no desenvolupen obesitat induïda per la dieta i presenten una ingesta reduïda (Wortley et al., 2005, Zigman et al., 2005) permet postular que la ràpida reducció de la ingesta induïda per l'OE sigui mitjançada pel descens de la producció de ghrelina.

Per una altra banda, s'ha vist que la ghrelina exerceix, almenys en part, el seu control central sobre la ingesta a través de la unió al seu receptor present en les neurones que coexpressen els neuropèptids orexigènics NPY i AgRP (Chen et al., 2004; Mondal et al., 2005; Wang et al., 2002), i que la restricció alimentària incrementa els nivells de ghrelina (Cummings

et al., 2002; Guaillo et al., 2002; Kim et al., 2003) augmentant l'expressió de NPY a nivell hipotalàmic (Brady et al., 1990). D'aquesta manera, l'acció de l'OE sobre la ghrelina ajudaria a prevenir l'increment compensatori dels nivells de NPY davant de la disminució de la ingesta. Aquest mecanisme podria explicar les diferències observades en l'expressió hipotalàmica del NPY entre els animals tractats amb oleoïl-estrona, on no s'observen canvis d'expressió respecte els controls, i els animals *pair-fed*, on si que s'observa un increment significatiu de l'expressió del NPY (Ferrer-Lorente et al., resultats no publicats).

Els clars efectes de reducció de l'expressió del gen de la ghrelina induïts per l'oleoïl-estrona contrasten amb la variabilitat trobada en els nivells d'aquest transcrit en el grup control, la qual podria ser conseqüència de la utilització de l'oli de girasol com a vehicle d'administració. Mentre que certs estudis mostren que l'elevat contingut lipídic d'algunes dietes pot reduir els nivells de ghrelina i la seva expressió en l'estómac (Moesgaard et al., 2004), d'altres presenten un increment de la secreció de ghrelina causat per aquestes dietes (Beck et al., 2002).

El fet de que l'oleoïl-estrona presenti un clar efecte inhibitori sobre l'expressió de la ghrelina, contrasta amb l'increment d'aquesta provocat per la unió dels estrògens al seu receptor α expressat en les cèl·lules productores de ghrelina (Sakata et al., 2006) i ens proporciona indirectament una prova més del caràcter no estrogènic de l'OE. A més, la poca capacitat de l'estómac per a hidrolitzar l'OE alliberant estrona (Serrano-Muñoz et al., 2007), ens reforça la idea de que els efectes de l'OE en l'estómac no estan mediat per l'estrona alliberada resultant de la seva hidròlisi.

L'oleoïl-estrona provoca una reducció de l'expressió de la CCK en l'intestí proximal, que no concorda amb la reducció de la ingesta induïda per l'OE a curt termini. La CCK actua com un dels principals senyals de sadollament (Moran, 2000), inhibint els efectes orexigènics de la ghrelina. Al mateix temps, en altres estudis, s'ha observat una inhibició recíproca entre ghrelina i CCK i dels respectius efectes sobre la gana i el sadollament (Date et al., 2005; Kobelt et al., 2005). En el present estudi, la situació és que l'expressió d'ambdós pèptids es veu reduïda en paral·lel amb la reducció de la ingesta.

Pel que fa a l'expressió dels altres dos pèptids anorexigènics, el GLP-1 i el PYY, no s'observen canvis significatius en els animals tractats amb oleoïl-estrona. Aquests resultats estarien d'acord amb que gran part de l'OE és absorbit en la part alta del tracte gastrointestinal, especialment a l'estómac, amb una pràcticament nul·la retenció i absorció de la molècula en els trams posteriors (Serrano-Muñoz et al., 2007). Dues hores després de l'administració de l'OE, aquesta roman en la seva majoria en el lumen estomacal; permanència que està d'acord amb que els principals efectes de l'oleoïl-estrona es trobin modulant l'expressió de ghrelina a l'estómac i la CCK en l'intestí proximal (duodè-jejú). El fet de que la part distal de l'intestí sigui el principal lloc de síntesi del GLP-1 i el PYY (Böttcher et al., 1984; Anini et al., 1999), juntament amb la presència de nombroses esterases al llarg de l'intestí (essencialment en jejú i

íleum) amb la capacitat d'hidrolitzar l'OE, poden justificar l'absència d'efectes de l'OE sobre el GLP-1 i el PYY, i no ens fa pensar en una absorció i acció de l'oleoïl-estrona intacte més enllà dels trams més proximals del sistema gastrointestinal.

VI. CONCLUSIONS

1. L'administració de baixes dosis d'estrone promou l'augment de pes, malgrat que elevades dosis d'estrone induïxen una reducció de les reserves de greix que podria ser conseqüència de la seva interconversió a oleoil-estrone.

2. El tamoxifè no evita la mobilització lipídica induïda per l'oleoil-estrone indicant que l'OE no actua a través dels receptors d'estrogen, tot i que el tamoxifè mimetitzava parcialment els efectes de l'OE. Així, seria convenient realitzar més estudis utilitzant bloquejants d'aquests receptors més específics que el tamoxifè per tal de garantir la seguretat en el tractament amb oleoil-estrone i confirmar la inexistència d'efectes estrogènics mediatos per la seva unió o la dels seus metabòlits als receptors d'estrogen.

3. La combinació de l'oleoil-estrone amb inhibidors de la recaptació de la serotonina com la dexfenfluramina i sobre tot la sibutramina, presenta un efecte additiu, sobre tot en la disminució de la ingesta, que induïx a una marcada pèrdua de pes com a resultat d'una marcada pèrdua de les reserves lipídiques dels animals tractats. Aquests resultats, fan pensar que l'OE no actuaria disminuint la ingesta a través de les vies serotoninèrgiques.

4. No s'observen efectes additius en la combinació de l'OE amb la fentermina, probablement pels pocs efectes antiobesitat que aquest fàrmac induïx per si mateix.

5. La combinació de l'OE amb un agonista β_3 -adrenèrgic com el CL316,243 provoca una molt forta reducció de l'energia corporal dels animals (més del 25% en 10 dies) en combinar-se una forta reducció de la ingesta amb una forta potenciació de la despesa energètica, tot mantenint l'homeòstasi circulant.

6. La manca d'efectes additius significatius quan combinem l'oleoil-estrone amb el rimonabant no ens dóna motius per pensar en una administració conjunta com una bona alternativa per al tractament de l'obesitat.

7. L'OE no actua sobre la gana a través dels mecanismes serotoninèrgics ni cannabinèrgics. Les dades de combinació de fàrmacs apunten a que el mecanisme d'acció de l'OE és propi i diferent dels enunciats més amunt i també dels estrògens.

8. Els efectes de l'OE i la rosiglitazona sobre l'expressió dels principals indicadors i reguladors del metabolisme energètic en el teixit adipós són gairebé oposats; mentre que l'oleoil-estrone induïx una depressió generalitzada de l'expressió de GLUT 4, ACC, FAS, adiponutrina i SREBP1c, la rosiglitazona la incrementa.

9. L'administració conjunta de l'oleoil-estrone amb la rosiglitazona permet una millora de la resistència a la insulina acompanyada d'una correcció per part de l'OE de l'acumulació de greix derivada de l'ús de les tiazolidinones. Així, el tractament combinat de oleoil-estrone i la rosiglitazona pot ser positiu per al pacient diabètic de tipus 2 que a més presenta obesitat o sobrepès o que presenta una marcada predisposició a l'acumulació de greixos.

10. L'oleoïl-estrona podria estar induint una pèrdua del greix en localitzacions extradiposes, com per exemple, en múscul i fetge. Aquesta utilització dels greixos per part de l'oleoïl-estrona podria ser un dels mecanismes pels quals l'OE contribueix a millorar la sensibilitat a la insulina.

11. El tractament oral amb oleoïl-estrona provoca una marcada i ràpida inhibició de l'expressió de ghrelina a l'estómac, que explicaria, almenys en part, la ràpida reducció de la ingesta i inducció de la sensació de sadollament induïda per l'OE.

12. Els efectes a curt termini de l'OE sobre els pèptids anorexigènics CCK, PYY i GLP-1 en la part distal del tracte gastrointestinal són pràcticament nuls, fet que estaria d'acord amb que majoritàriament l'oleoïl-estrona es absorbeix a nivell de l'estómac amb una pràcticament nul·la retenció i absorció de la molècula en els trams posteriors.

VII. BIBLIOGRAFIA

Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, et al. Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 335: 609-16, 1996.

Abbot CR. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide 1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res*, 1044: 127-131, 2005.

Abbot CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA, et al. Evidence of an orexigenic role for cocaine and amphetamine regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology*, 142: 3457-3463, 2001.

Adán C, Cabot C, Vilà R, Grasa MM, Masanés RM, Esteve M, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone treatment affects the ponderostat setting differently in lean and obese Zucker rats. *Int J Obes*, 23: 366-373, 1999a.

Adán C, Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Vilà R, Masanés RM, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Short-term treatment with estrone oleate in liposomes (Merlin-2) does not affect the expression of the gene ob in Zucker obese rats. *Mol Cell Biochem*, 197: 109-115, 1999b.

Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*, 89: 1070-1077, 1985.

Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*, 14: 242S-249S, 2006.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu DQ, Lowell B, Maratos-Flier, E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382: 250-252, 1996.

Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 21: 263-307, 2000.

Ahlskog JE, Hoebel BG. Overeating and obesity from damage to a noradrenergic system in the brain. *Science*, 182: 166-169, 1982.

Al-Adsani H, Hoffer LJ, Silva JE. Resting energy expenditure is sensitive to small dose changes in patients on chronic thyroid hormone replacement. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 1118-1125, 1997.

Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet*, 366: 1059-1062, 2005.

Alemany M. The Etiologic Basis for the Classification of Obesity. *Prog Food Nutr Sci*, 13: 45-66, 1989.

Alemany M. Control del peso corporal. Enciclopedia de las dietas y de la nutrición. Ed. Planeta, 2ª edición, Barcelona 1999.

Alemany M. Mecanismos de control del peso corporal. *Revista de la real Acadèmia de Medicina de Catalunya*, 18; 2: 44-49, 2003.

Alemany M, Fernández-López JA, Petrobelli A, Granada M, Foz M, Remesar X. Pérdida de peso en un paciente con obesidad mórbida en tratamiento con oleoil-estrona (Weight loss in a patient with morbid obesity under treatment with oleoyl-estrone). *Med Clin*, 121 (13): 496-499, 2003.

Alexander MJ, Miller MA, Dorsa DM, Bullock BP, Melloni RH, Dobner PR, Leeman SE. Distribution of neurotensin/neuromedin mRNA in rat forebrain: Unexpected abundance in hippocampus and subiculum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 5202-5206, 1989.

Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*, 221: 877-879, 1983.

ALS CNTF Treatment Study Group. A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 46: 1244-1249, 1996.

Amatruda JM, Harman SM, Pourmotabbed G, et al. Depressed plasma testosterone and fractional binding of testosterone in obese males. *J Clin Endocrinol Metab*, 47 (2): 268-271, 1978.

American Obesity Association. <http://www.obesity.org>.

Anderson KD, Lambert PD, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Activation of the hypothalamic arcuate nucleus predicts the anorectic actions of ciliary neurotrophic factor and leptin in intact and gold thioglucose-lesioned mice. *J Neuroendocrinol*, 15: 649-660, 2003.

Anderson LA, McTernan PG, Barnett AH, Kumar S. The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: Influence of gender and site. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5045-5051, 2001.

Anini Y, Fu-Cheng X, Cuber JC, Kervran A, Chariot J, Rozé C. Comparison of the postprandial release of peptide YY and proglucagon-derived peptides in the rat. *Pflügers Arch- Eur J Physiol*, 438: 299-306, 1999.

Anon. Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease: the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. *Circulation*, 102: 21-27, 2000.

Arch JR. The contribution of increased thermogenesis to the effect of anorectic drugs on body composition in mice. *Am J Clin Nutr*, 34: 2763-2769, 1981.

Arch JR. Beta(3)-adrenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress. *Eur J Pharmacol*, 440: 99-107, 2002.

Ardèvol A, Virgili J, Sanchis D, Adán C, Fernández-Real JM, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. A method for the measurement of plasma estrone fatty ester levels. *Anal Biochem*, 249: 247-250, 1997.

Argyropoulos G, Brown AM, Willi SM, Zhu J, He Y, Reitman M, et al. Effects of mutations in the human uncoupling protein 3 gene on the respiratory quotient and fat oxidation in severe obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 102: 1345-1351, 1998.

- Arita Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 257: 79-83, 1999.
- Arnone M, et al. Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology*, 132: 104-106, 1997.
- Arterburn DE, Crane PK, Veenstra DL. The efficacy and safety of sibutramine for weight loss: a systematic review. *Arch Intern Med*, 164: 994-1003, 2004.
- Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Nijima A, Meguid MM, Kasuga M. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology*, 124: 1325-1336, 2003.
- Asin KE, Bednarz L, Nikkel AL, Gore PA, Nadzan AM. A-71623, a selective CCK-A receptor agonist, suppresses food intake in the mouse, dog, and monkey. *Pharmacol Biochem Behav*, 42: 699-704, 1992.
- Atgié C, d'Allaire F, Bukowiecki LJ. Role of β_1 - and β_3 -adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. *American Journal of Physiology*, 273: 1136-1142, 1997.
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN. The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394: 790-793, 1998.
- Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure. *Gastroenterology*, 127: 546-558, 2004.
- Balada F, Sanchis D, Grasa MM, Virgili J, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes on the body weight of Zucker obese rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21: 789-795, 1997a.
- Balada F, Sanchis D, Grasa MM, Virgili J, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Differential short-term distribution of estrone and oleoyl-estrone administered in liposomes to lean and obese Zucker rats. *Obes Res*, 6 (1): 34-39, 1998.
- Balada F, Sanchis D, Virgili J, Grasa MM, Montserrat C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes on the body weight of rats fed a cafeteria diet. *Arch Physiol Biochem*, 105 (5): 487-495, 1997b.
- Balfour JA, McTavish D, Heel RC. Fenofibrate. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in dyslipidaemia. *Drugs*, 40: 260-290, 1990.
- Banerjee RR, Lazar MA. Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med*, 81: 218-226, 2003.
- Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Stepan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*, 303: 1195-1198, 2004.

Banks WA, Kastin AJ, Maness LM, Huang W, Jaspan JB. Permeability of the blood-brain barrier to amylin. *Life Sci*, 57: 1993-2001, 1995.

Barbany M, Foz Sala M. Obesidad. *Medicine*, 7; 110: 5145-5159, 1999.

Barbany Cahiz M, Foz Sala M. Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Jano*, 68; 1563: 1455-1461, 2005.

Barret-Connor E, Khaw KT. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A prospective population-based study. *Circulation*, 78 (3): 539-545, 1988.

Batkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, et al. Endogenous cannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation*, 110: 1996-2002, 2004.

Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghattei MA, Bloom SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med*, 349: 941-8, 2003.

Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghattei MA, Cone RD, Bloom SR. Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. *Nature*, 418: 650-654, 2002.

Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA, Park AJ, Ellis SM, Patterson M, Frost GS, Ghattei MA, Bloom SR. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 4696-4701, 2003.

Baumgartner RN, Waters DL, Morley JE, Patrick P, Montoya GD, Garry PJ. Age-related changes in sex hormones affect the sex difference in serum leptin independently of changes in body fat. *Metabolism*, 48: 378-384, 1999.

Beck B, Musse N, Stricker-Krongrad A. Ghrelin, Macronutrient intake and dietary preferences in Long-Evans rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 292: 1031-1035, 2002.

Beck B, Richy S. Hypothalamic hypocretin/orexin and neuropeptide Y: divergent interaction with energy depletion and leptin. *Biochem Biophys Res Commun*, 258: 119-122, 1999.

Beck B, Stricker-Krongrad A, Richy S, Burlet C. Evidence that hypothalamic neurotensin signals leptin effects on feeding behavior in normal and fat-preferring rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 252: 634-638, 1998.

Ben-Menachem E, Axelsen M, Johanson EH, et al. Predictors of weight loss in adults with topiramate-treated epilepsy. *Obes Res*, 11:556-62, 2003.

Bennett JMH, Mehta S, Rhodes M. Surgery for morbid obesity. *Postgrad Med J*, 83: 8-15, 2007

Benoit S, Schwartz M, Baskin D, Woods SC, Seeley RJ. CNS melanocortin system involvement in the regulation of food intake. *Horm Behav*, 37: 299-305, 2000.

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

Berlan M, Galitzky J, Rivière D, et al. Plasma catecholamine levels and lipid mobilization induced by yohimbine in obese and non-obese women. *Int J Obes*, 15: 305-15, 1991.

Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: Ingestion behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*, 20: 189-287, 1996.

Bertagna X. Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 23: 467-485, 1994.

Berthoud HR, Bereiter DA, Trimble ER, et al. Cephalic phase, reflex insulin secretion. Neuroanatomical and physiological characterization. *Diabetologia*, 20: 393-401, 1981.

Bessard T, Schutz Y, Yequier E. Energy expenditure and postprandial thermogenesis in obese women before and after weight loss. *Am J Clin Nutr*, 8: 680-94, 1983.

Bhargava SK, Sachdev HS, Fall CH, Osmond C, Lakshmy R, Barker DJ, Biswas SK, Ramji S, Prabhakaran D, Reddy KS. Relation of serial changes in childhood body-mass index to impaired glucose tolerance in young adulthood. *N Engl J Med*, 350: 865-875, 2004.

Bishop MJ. Approaches to antiobesity therapy. An introduction. *J Med Chem*, 49 (14): 3999-4000, 2006.

Bjenning C, Whelen K, Gonzalez L, Thomsen W, Saldana H, Espitia S, Sengupta D, Cheng Rp, Smith B, Webb R, Estranda S, et al. Increased sensitivity in female obesity-prone rats. The weight less effects of APD356, a selective 5-HT_{2c} agonist. *Obes Res*, 12 (Suppl 3): Abs A140, 2004.

Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*, 1: 619-625, 1998.

Björntorp P. Endocrine abnormalities of obesity. *Metabolism*, 44 (9, Suppl 3): 21-23, 1995.

Björntorp P. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes Rev*, 2: 73-86, 2001.

Björntorp P, Rosmond R. Obesity and cortisol. *Nutrition*, 16: 924-936, 2000.

Blay M, Peinado-Onsurbe P, Grasa MM, Díaz-Silva MM, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone treatment on plasma lipoproteins and tissue lipase activities of Zucker lean and obese female rats. *Int J Obesity*, 26: 618-626, 2002.

Blevins JE, Stanley BG, Reidelberger RD. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. *Brain Res*, 860: 1-10, 2000.

Bloomquist BT, Eipper BA, Mains RE. Prohormone-converting enzymes: regulation and evaluation of function using antisense RNA. *Mol Endocrinol*, 5: 2014-2024, 1991.

Bluher M, et al. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue andocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes*, 55: 3053-3060, 2006.

Blundell JE, Green SM. Effect of sucrose and sweeteners on appetite and energy intake. *Int J Obes*, 20: 12-17, 1996.

Boeles S, Williams C, Campling GM, et al. Sumatriptan decreases food intake and increases plasma growth hormone in healthy women. *Psychopharmacology*, 129: 179-182, 1997.

Boggiano MM, Chandler PC, Oswald KD, Rodgers RJ, Blundell JE, Ishii Y, Beattie AH, Holch P, Allison DB, Schindler M, Arndt K, et al. PYY3-36 as an anti-obesity drug target. *Obes Res*, 6 (4): 307-322, 2005.

Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeaon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I, Blackburn TP, Branchek TA, Gerald C, Vaysse PJ, Forray C. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med*, 8: 825-830, 2002.

Borsini F, Bendotti C, Carli M, Poggese E, Cohen H. The roles of brain noradrenaline and dopamine in the anorectic activity of diethylpropion in rats: a comparison with d-amphetamine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 26: 3-11, 1992.

Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3. Potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes*, 49: 143-156, 2000.

Bouchard C. The biological predisposition to obesity: beyond the thrifty genotype scenario. *Int J Obes*, 31 (9): 1337-1339, 2007.

Bouchard C, Tremblay A, Depres JP, et al. The response to long term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*, 322: 1477-82, 1990.

Böttcher G, Sjölund K, Eckblad E, Hakanson R, Swartz TW, Sundler F. Coexistence of peptide YY and glicentin immunoreactivity in endocrine cells of the gut. *Regul Pept*, 8: 261-266, 1984.

Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*, 304: 108-110, 2004.

Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology*, 52: 441-447, 1990.

Bray GA. Obesity: The disease. *J Med Chem*, 49 (14): 4001-4007, 2006.

Bray GA, Blackburn GL, Ferguson JM, Greenway FL, Jain AK, Mendel CM, et al. Sibutramine produces dose-related weight loss. *Obes Res*, 7: 189-8, 1999.

- Bray GA, York DA. Genetically Transmitted Obesity in Rodents. *Physiol Rev*, 51 (3): 598-646, 1971.
- Brind J, Stain G, Miller L, Zumoff B, Vogelmann J, Orentreich N. Obese men have elevated- plasma levels of estrone sulfate. *Int J Obes*, 14: 483-486.
- Bristol-Myers Squibb. Solvay Pharmaceuticals and Bristol-Myers Squibb in joint development and future commercialization of novel obesity compound. *Company Website*, May 17, 2004.
- Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: Relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*, 402: 460-474, 1998.
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 15043-15048, 1998.
- Brubaker PL, Anini Y. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Can J Physiol Pharmacol*, 81: 1005-1012, 2003.
- Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, 289: 2122-2125, 2000.
- Bryson JM. The future of leptin and leptin analogues in the treatment of obesity. *Diabetes Obes Metab*, 2: 83-89, 2000.
- Bukowiecki L, Follea N, Jahjah L. Ephedrine, a potential slimming drug, directly stimulates thermogenesis in brown adipocytes via β -adrenoreceptors. *Int J Obes*, 6: 343-350, 1982.
- Cabanac M. Regulation and the ponderostat. *Int J Obesity*, 25 (5): S7-S12, 2001.
- Cabot C, Esteve M, Grasa MM, Vilà R, Adán C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Potenciación de la respuesta insulínica a una sobrecarga oral de glucosa en ratas Zucker obesas tratadas con oleoil-estrone. *Endocrinol Nutr*, 49 (1): 9-12, 2002.
- Cabot C, Grasa MM, Adán C, Pérez-Clausell J, Virgili J, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoil-estrone does not alter hypothalamic neuropeptide Y in Zucker lean and obese rats. *Peptides*, 19: 1631-1635, 1998a.
- Cabot C, Grasa MM, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Zucker obese rats are insensitive to the CRH-increasing effect of oleoil-estrone. *Brain Res Bull*, 46: 529-534, 1998b.
- Cabot C, Grasa MM, Fernández-López JA, Alemany M. Oleoil-estrone treatment reduces the volume of white adipose tissue cells in the rat. *J Physiol Biochem*, 56 (4): 369-370, 2000a.

Cabot C, Grasa MM, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oleoyl-estrone treatment on the expression of β_1 - β_2 - and β_3 -adrenoreceptors in rat adipose tissues. *Mol Cell Biochem*, 221: 109-115, 2001a.

Cabot C, Grasa MM, Massanés RM, de Matteis R, Cinti S, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone does not have direct estrogenic effects on rats. *Life Sci*, 69: 749-761, 2001b.

Cabot C, Salas A, Ferrer-Lorente R, Savall P, Remesar X, Fernández-López JA, Esteve M, Alemany M. Short-term oral oleoyl-estrone treatment increases plasma cholesterol turnover in the rat. *Int J Obesity*, 29 (5): 534-539, 2005.

Calapai G. Leptin increases serotonin turnover by inhibition of brain nitric oxide synthesis. *J Clin Invest*, 104: 975-982, 1999.

Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 1319-1324, 2004.

Cameron Aj, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 33: 351-375, 2004.

Cancello R, Tounian A, Poitou C, Clément K. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabet Metabol*, 30 (3): 215-227, 2004.

Carey DG, Cowin GJ, Galloway GJ et al. Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients. *Obesity Res*, 10: 1008-15, 2002.

Carlsson A. Amphetamine and brain catecholamines. En: Costa E and Garattini S (ed). Amphetamine and related compounds. *Raven Press: New York*, 289-300, 1970.

Carpéné C, Bousquet-Mélou A, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M. Lipolytic effects of β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 839: 186-189, 1998.

Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 2404-2411, 2003.

Casabiell X, Pineiro V, Tome MA, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 4270-4273, 1997.

Castillo EJ, Delgado-Aros S, Camilleri M, Burton D, Stephens D, O'Connor-Semmes R, Walker A, Shachoy-Clark A, Zinsmeister AR. Effect of oral CCK-1 agonist GI181771X on fasting and postprandial gastric functions in healthy volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(2): G363-G369, 2004.

- Castro MG, Morrison E. Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev Neurobiol*, 11: 35-57, 1997.
- Caul WF, Jones JR, Barrett RJ. Amphetamine's effects on food consumption and body weight. The role of adaptive processes. *Behav Neurosci*, 102: 441-450, 1988.
- Chagnon YC, Bouchard C. Genetics of obesity: Advances from rodent studies. *Tr.Genet.* 12:441-444, 1996.
- Chakravarthy MV, Booth FW. Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol*, 96: 3-10, 2004.
- Chalmers DT, Lovenberg TW, Grigoriadis DE, Behan DP, De Souza EB. Corticotropin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. *Trends Pharmacol Sci*, 17: 166-172, 1996.
- Chandran M, Phillips SA; Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*, 26 (8): 2442-2450, 2003.
- Chapman I, Parker B, Doran S, Feinie-Bisset C, Wishart J, Srobel S, Wang Y, Burns C, Lush C, Weyer C, Horowitz M. Effect of pramlintide on satiety and food intake in obese subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 48(5):838-848, 2005.
- Chaput JP, Tremblay A. Current and novel approaches to the drug therapy of obesity. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 62 (10):793-803, 2006.
- Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Phil Trans R Soc B. Publicat online*, 2006.
- Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. Inactivations of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet*, 26: 97-102, 2000.
- Chen AS, Metzger JM, Trumbauer ME, Guan XM, Yu H, Frazier EG. Role of melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res*, 9: 155-159, 2000.
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Fraizer ZS, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*, 145: 2607-2612, 2004.
- Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, Kennedy BP, Tremblay ML. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell*, 2: 497-503, 2002.
- Cinti S. The adipose organ. *Editrice Kurtis Milano*, 1999.

Cinti S, Matteis RD, Pico C, Ceresi E, Obrador A, Maffei C, Oliver J, Palou A. Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: 789-793, 2000.

Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:4696-701, 2003.

Colletta AA, Benson JR, Baum M. Alternative mechanisms of action of anti-estrogens. *Breast Cancer Treat*, 31: 5-9, 1994.

Collins S, Kuhn C, Petro A, Swich A, Chrnyk B, Surwit R. Role of leptin in fat regulation. *Nature*, 380: 677, 1996.

Colwell JA. Antiplatelet agents for the prevention of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *AM J Cardiovasc Drugs*, 4: 87-106, 2004.

Comisión Europea. <http://ec.europa.eu>.

Commins SP, Watson PM, Padgett MA, Dudley A, Argyropoulos G, Gettys TW. Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinology*, 140: 292-300, 1999.

Coniff RF, Shapiro JA, Seaton TB, et al. A double-blind placebo-controlled trial evaluating the safety and efficacy of acarbose for the treatment of patients with insulin-requiring type II diabetes. *Diabetes Care*, 18: 928-932, 1995.

Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, Hensrud DD, et al. Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N Engl J Med*, 337:581-8, 1997.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334: 292-295, 1996.

Conway B, Rene A. Obesity as a disease: no lightweight matter. *Obesity reviews* 5: 145-151, 2004.

Cooke D, Bloom S. The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nature reviews*, 5:919-931, 2006.

Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med*, 229: 1127-1135, 2004.

Corner J, Aronne LJ. Pharmacological approaches to weight reduction: therapeutic targets. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 2616-2621, 2004.

Costet P, Legendre C, More J, Edgar A, Galtier P, Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem*, 273: 29577-29585, 1998.

- Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, Schauer PR. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg*, 14 (5): 589-600, 2004.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411: 480-484, 2001.
- Crandall DL, Quinet EM, Morgan GA, Busler DE, McHendry-Rinde B, Kral JG. Synthesis and secretion of plasminogen activator inhibitor-1 by human preadipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (9): 3222-3227, 1999.
- Crawford DA, Jeffery RW, and S. A. French. Television viewing, physical inactivity and obesity. *Int J Obesity*, 23: 437-440, 1999.
- Crespi EJ, Vaudari H, Denver RJ. Roles of corticotropin-releasing factor, neuropeptide Y and corticosterone in the regulation of food intake in *Xenopus laevis*. *J Neuroendocrinol*, 16; 3: 279-288, 2004.
- Cui H, Cai F, Belsham DD. Anorexigenic hormones leptin, insulin and α menocyte stimulating hormone directly induce neurotensin (NT) gene expression in novel N-T expressing cell models. *J Neurosci*, 25; 41: 9497-9506, 2005.
- Cullell-Young M and del Fresno M. Oleoyl-estrone. *Drugs of the Future* 27 (7): 648-654, 2002.
- Cummings DE, Foster-Schubert KE, Overduin J. Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets*, 6: 153-169, 2005.
- Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food- related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287: E297-E304, 2004.
- Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*, 117; 1: 13-23, 2007.
- Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric by-pass surgery. *N Engl J Med*, 346:1623-30, 2002.
- Cupples WA. Regulation of body weight. *Am.J.Physiol.* 282:R1264-R1266, 2002.
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*, 53 (5): 1285-1292, 2004.
- Curran MP, Scott LJ. Orlistat: a review of its use in the management of patients with obesity. *Drugs*, 64: 2845-2864, 2004.
- Czech MP. Molecular actions of insulin on glucose transport. *Annu Rev Nutr*, 15: 441-471, 1995.

Dabelea D, Pettitt DJ, Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC. Birth weight, type 2 diabetes, and insulin resistance in Pima Indian children and young adults. *Diabetes Care*, 22:944-950, 1999.

Dakin CL. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology*, 142: 4244-4250, 2001.

Dakin CL. Peripheral oxyntomodulin reduce food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology*, 145: 2687-2695, 2004.

D'Alessio DA, Kieffer TJ, Taborsky GJ, Havel PJ. Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-induced insulin secretion in rhesus macaques. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1253-1259, 2001.

Daly PA, Krieger DR, Dulloo AG, et al. Ephedrine, caffeine and aspirin: safety and efficacy for treatment of human obesity. *Int.J.Obesity*, 17 (Suppl 1): 73-8, 1993.

Danilovich N, Babu PS, Xing W, Gerdes M, Krishnamurthy H, Sairam MR. Estrogen deficiency, obesity, and skeletal abnormalities in follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) female mice. *Endocrinology*, 141: 4295-4308, 2000.

Das SK, Chakrabarti R. Antiobesity therapy: Emerging drugs and targets. *Curr Med Chem*. 13 (12): 1429-1460, 2006.

Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T, Nijima A, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology*, 146: 3518-3525, 2005.

Davidson MH, Hauptman J, DiGirolamo M, Foreyt JP, Halsted CH, et al. Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a reandomized controlled trial. *JAMA*, 281: 235-242, 1999.

Davis R, Faulds D. Dexfenfluramine: an updated review of its therapeutic use in the management of obesity. *Drugs*, 52: 696-724, 1996.

Decombaz JE, Bloemhard Y, Reffet B. 1-Carnitine supplementation, caffeine and fuel oxidation in the exercising rat. *Nutr Res*, 7: 923-933, 1987.

De la Torre X, Segura J, Poletini A, Montagna M. Detection of testosterone esters in humans plasma. *J Mass Spectrom*, 30: 1393-1404, 1995.

De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, Von den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliff JG. The hypocretins: Hypothalamic-specific peptide with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 322-327, 1998.

Delparigi A, Tschöp M, Heiman ML, et al. High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:5461-4, 2002.

Delporte ML, Funahashi T, Takahashi M, Matsuzawa Y, Brichard SM. Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem J*, 367: 677-685, 2002.

De Souza CJ, Hirshman MF, Horton ES. CL-316,243, a β_3 -specific adrenoceptor agonist, enhances insulin-stimulated glucose disposal in nonobese rats. *Diabetes*, 46: 1257-1263, 1997.

Després JP, Golay A, Sjöström L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*, 353: 2121-2134, 2005.

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444 (7121): 881-887, 2006.

De Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. Induction of ob gene-expression by corticosteroids is accompanied by body-weight loss and reduced food-intake. *J Biol Chem*, 270: 15958-15961, 1995.

Dhurandhar NV, Kulkarni PR, Ajinkya SM, Sherikar AA, Atkinson RL. Association of adenovirus infection with human obesity. *Obes Res*, 5:464-469, 1997.

Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME, Atkinson RL. Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: 989-996, 2000.

Diamond LE, Earle DC, Rosen RC, Willett MS, Molinoff PB. Double-blind, placebo-controlled evaluation of the safety, pharmacokinetic properties and pharmacodynamic effects of intranasal pt-141, a melanocortin receptor agonist, in healthy males and patients with mild-to-moderate erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 16: 51-59, 2004.

Díaz-Silva M, Grasa MM, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone on the energy balance of diabetic rats. *Horm Metabol Res*, 35 (8): 471-478, 2003.

Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*, 148 (3): 293-300, 2003.

Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 410: 822-825, 2001.

Douglass J, Mc Kinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci*, 15: 2471-2481, 1995.

Drent ML, Larsson I, William-Olsson T, et al. Orlistat (RO 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: A multiple dose study. *Int J Obes*, 19: 221-226, 1995.

Dressel U, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol*, 17: 2477-2493, 2003.

- Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab*, 3: 153-165, 2006.
- Dube MG, Xu B, Crowley WR, et al. Evidence that neuropeptide Y is a physiological signal for normal food intake. *Brain Res*, 646: 341-344, 1994.
- Dubuc PU. Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 180: 468-473, 1985.
- Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, Devaud H, Buyse M, Bado. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes*, 54: 348-345, 2005.
- Dulloo AG, Jacquet J. An adipose specific control of thermogenesis in body weight regulation. *Int J Obes*, 25 (Suppl. 5): S22-29, 2001.
- Dulloo AG, Miller DS. Prevention of genetic fa/fa obesity with an ephedrine-methylxantines thermogenic mixture. *Am J Physiol*, 252: 507-513, 1987.
- Dulloo AG, Seydoux J, Jacquet J. Adaptive thermogenesis and uncoupling proteins: a reappraisal of their roles in fat metabolism and energy balance. *Physiology & Behavior*, 83: 587-602, 2004.
- Dunkelman SS, Fairhurst B, Plager J, Waterhouse C. Cortisol metabolism in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 24: 832-841, 1964.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 365; 9468: 1415-1428, 2005.
- Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol*, 3: R7-R12, 1999.
- Edwards GL, Ladenheim EE, Ritter RC. Dorsomedial hindbrain participation in cholecystokinin-induced satiety. *Am J Physiol*, 251: R971-R977, 1986.
- Einhorn D, Rendell M, Rosenzweig J, et al. Pioglitazone hydrochloride in combination with metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. The Pioglitazone 027 Study Group. *Clin Ther*, 22: 1395-1409, 2000.
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Coucyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, 21; 6: 1375-1385, 1998.
- Elmquist JK, Ahimsa RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95; 2: 741-746, 1998.
- Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*, 395: 535-547, 1998.

Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: Hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 22: 221-232, 1999.

Emptoz-Bonneton A, Cousin P, Seguchi K, Avvakumov GV, Bully C, Hammond GL, et al. Novel human corticosteroid-binding globulin variant with low cortisol-binding affinity. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 361-367, 2000.

Engeli S, et al. Activation of the peripheral andocannabinoid system in human obesity. *Diabetes*, 54: 2838-2843, 2005.

English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2984, 2002.

Erickson JC, Holoopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*, 274: 1704-1707, 1996.

Erondu N et al, Neuropeptide Y5 receptor antagonism does not induce clinically meaningful weight loss in overweight and obese adults. *Cell Metab*, 4: 275-282, 2006.

Esteve M, Savall P, Blay MT, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Intestinal handling of an oral oleoyl-estrone gavage by the rat. *Life Sci*, 69: 763-777, 2001b.

Esteve M, Virgili J, Aguilar H, Balada F, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Leptin enhances the synthesis of oleoyl-estrone from estrone in white adipose tissue. *Eur J Nutr*, 38: 99-104, 1999.

Esteve M, Savall P, Virgili J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Modulation by leptin, insulin and corticosterone of oleoyl-estrone synthesis in cultured 3T3 L1 cells. *Biosci Rep*, 21 (6): 755-763, 2001a.

Ettinger MP, Littlejohn TW, Schwartz SL, et al. Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized dose-ranging study. *JAMA*, 289: 1826-32, 2003.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. 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 (5): 2273-2282, 2004.

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385: 165-168, 1997.

Farooqi IS, Drop S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenbein S, Challis BG, O'Rahilly S. Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes*, 55: 2549-2553, 2006.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IS, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*, 341: 879-884, 1999.

Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med*, 348: 1085-1095, 2003.

Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev*, 27: 710-718, 2006.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 1084-1089, 2002.

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

Faust M. Signals from Adipose Tissue. In: *The Body Weight Regulation System: Normal and Disturbed Mechanisms*, edited by L. A. Cioffi, W. P. T. James, and T. B. van Itallie, New York: Raven Press, 39-43, 1981.

Feher T, Bodrogi L. A comparative study of steroid concentrations in human adipose tissue and the peripheral circulation. *Clin Chim Acta*, 126: 135-141, 1982.

Fehmann HC, Jiang J, Schweinfurth J, Wheeler MB, Boyd AE III, Goke B. Stable expression of the rat GLP-1 receptor in CHO cells: activation and binding characteristics utilizing GLP-1 (7-36) amide, oxyntomodulin, exendin-4, and exendin (9-39). *Peptides*, 15: 453-456, 1994.

Fernández-López JA, Rafecas I, Remesar X, Alemany M. La leptina y el control de los recursos energéticos. *Nutrición y Obesidad*, 2: 32-42, 1999.

Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Ventajas teóricas del índice de Rohrer (P/A^3) sobre el índice de masa corporal (P/A^2) para la estimación de la adiposidad en humanos. *Rev Esp Obes*, 3 (1): 47-55, 2005.

Fernández-López JA, Remesar X, Foz M, Alemany M. Pharmacological Approaches for the Treatment of Obesity. *Drugs*, 62(6): 915-944, 2002.

Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev*, 24 (3): 278-301, 2003.

Fernández-Real JM, Sanchis D, Ricart W, Casamitjana R, Balada F, Remesar X, Alemany M. Plasma oestrone-fatty acid ester levels are correlated with body fat mass in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 50 (2): 253-260, 1999.

Fève B, Baude B, Krief S, Strosberg AD, Pairault J, Wmoline LJ. Inhibition by dexamethasone of β_3 -adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442A adipocytes: evidence for a transcriptional mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 15909-15915, 1992.

Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 23 (116): 337-350, 2004.

Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest*, 101(3):515-520, 1998.

Fogtelloo AJ, Pijl H, Frolich M, McCamish M, Meinders AE. Effects of recombinant human leptin treatment as an adjunct of moderate energy restriction on body weight, resting energy expenditure and energy intake in obese humans. *Diabetes Nutr Metab*, 16: 109-114, 2003.

Fonseca V, Rosenstock J, Patwardhan R, et al. Effect of metformin and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *JAMA*, 283: 1695-1702, 2000.

Foster-Schubert KE, Cummings DE. Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocr Rev*, 27(7): 779-793, 2006.

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

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395: 763-770, 1998.

Friedman TC, Mastorakos G, Newman TD, Mullen NM, Horton EG, Costello R, et al. Carbohydrate and lipid metabolism in endogenous hypercortisolism: shared features with metabolic syndrome X and non insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr J*, 43: 645-655, 1996.

Fride E, Bregman T, Kirkham TC. Endocannabinoids and food intake: Newborn suckling and appetite regulation in adulthood. *Exp Biol Med*, 230: 225-234, 2005.

Fritsche A, Wahl HG, Metzinger E, Renn W, Kellerer M, Häring H et al. Evidence for inhibition of leptin secretion by catecholamines in man. *Exp Clin Endocrinol Diab*, 106: 415-418, 1998.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, et al. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature*, 425:90-93, 2003.

Fujimoto K, Fukagawa K, Sakata T, Tso P. Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats. *J Clin Invest*, 91: 1830-1833, 1993.

Fujioka K, Seaton TB, Rowe E, Jelinek CA, Raskin P, Lebovitz HE, et al. Sibutramine/Diabetes Clinical Study Group. Weight loss with sibutramine improves glycaemic control and other metabolic parameters in obese patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*, 2: 175-187, 2000.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307: 426-430, 2005.

Funahashi H, Hori T, Shimoda Y, Mizushima H, Ryushi T, Katoh S, Shioda S. Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus. *Regulat Pept*, 92; 1-3: 31-35, 2000.

Gadde KM, Franciscy DM, Wagner II HR, et al. Zonisamide for weight loss in obese adults: a randomized controlled trial. *JAMA*, 289: 1820-1825, 2003.

Garcia Luna PP, Pereira Cunill JL, Lopez Pardo F, Astorga R. Seguridad cardíaca y sibutramina. *Med Clin*, 119: 356-359, 2002.

Gardin JM, Schumacher D, Constantine G, Davis KD, Leung C, Reid CL. Valvular abnormalities and cardiovascular status following exposure to dexfenfluramine or phentermine/fenfluramine. *JAMA* 283:1703-1709, 2000.

Gardner G, Halweil B. Overfed and underfed: the global epidemic of malnutrition. Worldwatch Institute, March, 2000: <http://www.worldwatch.Org/node/840> (accepted Jan 20, 2006).

Garrow JS, Webster J. Quetelet's index (w/h^2) as a measure of fatness. *Int J Obes*, 9: 147-153, 1985.

Gault VA, Flatt PR, O'Harte FP. Glucose- dependent insulinotropic polypeptide analogues and their therapeutic potential for the treatment of obesity-diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 308: 207-213, 2003.

Gazzaniga JM, Lupton JR. Dilution effect of dietary fiber sources – an in vivo study in the rat. *Nutr Res*, 7: 1261-1268, 1987.

Geary N, Asarian L, Korach KS, Ptaff DW, Ogawa S. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinology*, 142: 4751-4757, 2001.

Gehlert DR. Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *NeuroPeptides*, 33: 329-338, 1999.

Ghezzi P, Cerami A. Tumor necrosis factor as a pharmacological target. *Mol Biotechnol*, 31 (3): 239-244, 2005.

Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature*, 245: 323-325, 1973.

Giugliano D, Quatraro A, Consoli G, et al. Metformin for obese, insulin-treated diabetic patients: improvement in glycaemic control and reduction of metabolic risk factors. *Eur J Clin Pharmacol*, 44: 107-112, 1993.

GlaxoSmithKline: GlaxoSmithKline reviews novel therapeutics for CNS disorders and confirms strong pipeline momentum. *Press Release*, November 23, 2004.

Gloaguen I, Costa P, Demartis A, Lazzaro D, Di Marco A, Graziani R, Paonessa G, Chen F, Rosenblum CI, Van der Ploeg LH, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 6456-6461, 1997.

Glueck CJ, Streicher PA, Illig EK, et al. Dietary-fat substitutes. *Nutr Res*, 14: 1605-1619, 1994.

Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2988, 2002.

Gokcel A, Karakose H, Ertorer EM, Tanci N, Tutuncu NB, Guvener N, Effects of sibutramine in obese female subjects with type 2 diabetes mellitus and poor blood glucose control. *Diabetes Care*, 24: 1957-1960, 2001.

Goldstein DJ, Rampey AH Jr, Enas GG, Potvin JH, Fludzinski LLA, Levine LR. Fluoxetine: A randomized clinical trial in the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 18(3):129-135, 1994.

Gómez-Ambrosi J. Control del peso corporal. Perspectivas actuales. *Endocrinol Nutr*. 51 (7): 397-400, 2004.

Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL. Overexpression of AGRP leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet*, 17; 3: 273-274.

Granneman JG, Lahners KN. Analysis of human and rodent β 3-adrenergic receptor messenger ribonucleic acids. *Endocrinology*, 135: 1025-1031, 1994.

Grasa MM. Glucocorticoides y obesidad. *Rev Esp Obes*. Vol II (1): 13-30, 2004.

Grasa MM, Cabot C, Esteve M, Yubero P, Masanés RM, Blay MT, Vilà R, López-Martí J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Daily oral oleoyl-estrone gavage induces a dose-dependent loss of fat in Wistar rats. *Obes Res*, 9 (3): 202-209, 2001a.

Grasa MM, Cabot C, Adán C, Vilà R, Esteve M, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of adrenalectomy on the slimming activity of liposome-carried oleoyl-estrone in the rat. *Int J Obes*, 22: 1225-1230, 1998b.

Grasa MM, Cabot C, Adán C, Sanchos D, Balada F, Estruch J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of oleoyl-estrone administration on corticosterone binding to tissues of lean and obese Zucker rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 66: 165-169, 1998a.

Grasa MM, Vilà R, Esteve M, Cabot C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone lowers the body weight of both *ob/ob* and *db/db* mice. *Horm Metabol Res*, 32: 246-250, 2000.

Grasa MM, Esteve M, Masanés RM, Yubero P, Blay MT, López-Martí J, Cabot C, Vilà R, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oral gavage of oleoyl-estrone has a stronger effect on body weight in male Zucker obese rats than in female. *Diabet Obes Metabol*, 3: 203-208, 2001b.

Gray JM, Nunez AA, Siegel LI, Wade GN. Effects of testosterone on body weight and adipose tissue: role of aromatization. *Physiol Behav*, 23: 465-469, 1979.

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

Groop LC. Sulfonylurea sans NIDDM. *Diabetes Care*, 15:737-54, 1992.

Grover GJ, Mellstrom K, Malm J. Therapeutic potential for thyroid hormone receptor- β selective agonists for treating obesity, hyperlipidemia and diabetes. *Current Vascular Pharmacology*, 5: 141-154, 2007.

Grover GJ, Mellstrom K, Malm J, Li YL, et al. Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 10067-10072, 2003.

Grunfeld C, Feingold KR. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy*, 3: 143-158, 1991.

Gualillo O, Caminos JE, Nogueiras R, Seoane LM, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF, Diéguez C. Effect of food restriction on ghrelin in normal cycling female rats and in pregnancy. *Obesity Research*, 10: 682-687, 2002.

Guerciolini R. Mode of acting of orlistat. *Int J Obes*, 21 (Suppl 1):12S-23S, 1997.

Guilmeau S, Buyse M, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A. Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion, evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. *Diabetes*, 52: 1664-1672, 2003.

Guler HP, Ettinger MP, Littlejohn TW. Axl kinase causes significant weight loss in severely and morbidly obese subjects. *Int J Obes*, 25: S111, 2001.

Gutzwiller JP, Drewe J, Hildebrand P, Rossi L, Lauper JZ, Beglinger C. Effect of intravenous human gastrin-releasing peptide on food intake in humans. *Gastroenterology*, 106: 1168-1173, 1994.

Guzman M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blazquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *J Biol Chem*, 279: 27849-27854, 2004.

Habeck M. A succulent cure to end obesity. *Drug Discov Today*, 7:280-1, 2002.

Hadler AJ. Mazindol, a new non-amphetamine anorexigenic agent. *J Clin Pharmacol*, 12: 453-458, 1990.

Hagan MM. Peptide YY: a key mediator of orexigenic behavior. *Peptides*, 23: 377-382, 2002.

Halford JCG. Pharmacology of appetite suppression: Implication for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets*, 2: 353-370, 2001.

Halford JCG, Cooper GD, Dovey TM. The pharmacology of human appetite expression. *Curr Drug Targets*, 5(3):221-240, 2004.

Halford JCG, Harrold JA, Boyland EJ, Lawton CL, Blundell JE. Serotonergic drugs: Effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs*, 67: 27-55, 2007.

Halford JCG, Harrold JA, Lawton CL, Blundell JE. Serotonin (5-HT) drugs: Effects on appetite expression and use for treatment of obesity. *Curr Drug Targets*, 6; 2: 201-213, 2005.

Halford JCG. Obesity drugs in clinical development. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 7; 4: 12-318, 2006.

Hanotin C, Thomas F, Jones SP, Leutenegger E, Drouin P. Efficacy and tolerability of sibutramine in obese patients: a dose-ranging study. *Int J Obes*, 22: 32-38, 1998.

Hansen DL, Toubro S, Stock MJ, Macdonald IA, Astrup A. The effect of sibutramine on energy expenditure and appetite during chronic treatment without dietary restriction. *Int J Obes*, 23: 1016-1024, 1999.

Harfstrand A, Fuxe K, Agnati LF, Benfenati F, Goldstein M. Receptor autoradiographical evidence for high densities of ¹²⁵I-neuropeptide Y binding sites in the nucleus tractus solitarius of the normal male rat. *Acta physiol Scand*, 128: 195-200, 1986.

Harris RBS. Role of set-point theory in regulation of body weight. *FASEB J*, 4: 3310-3318, 1990.

Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nilni EA, Bjorbaek C. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signalling. *J Clin Invest*, 107: 111-120, 2001.

Harwood HJ Jr. Acetyl-CoA carboxylase inhibition for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Opin Invest Drugs*, 5 (3): 283-289, 2004.

Hausberger FX. Parabiosis and transplantation experiments in hereditarily obese mice. *Anat Rec*, 130: 313, 1958.

Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med*, 2: 949-950, 1996.

Havel PJ, Townsend R, Chaump L, Teff K. High-fat meals reduce 24-h circulating leptin concentrations in women. *Diabetes*, 48: 334-41, 1999.

Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest*, 100: 270-278, 1997.

Heal DJ, Aspley S, Prow MR, et al. Sibutramine: a novel antiobesity drug. A review of the pharmacological evidence to differentiate it from d-amphetamine and d-fenfluramine. *Int J Obes*, 22 (S1): 18-28, 1998.

Heffernan MA, Jiang WJ, Thorburn AW, et al. Effects of oral administration of a synthetic fragment of human growth hormone on lipid metabolism. *Am J Physiol*, 279: 501-507, 2000.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 12729-12734, 2000.

Heinrichs SC, Cole BJ, Pich EM, Menzaghi F, Koob GF, Hauger RL. Endogenous corticotropin-releasing factor modulates feeding induced by neuropeptide Y or a tail-pinch stressor. *Peptides*, 13: 879-884, 1991.

Heinrichs SC, Menzaghi F, Koob GF. Neuropeptide Y induced feeding and its control. *Vitam Horm*, 54: 51-66, 1998.

Heisler LK, Cowley MA, Kishi T, et al. Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *N Y Acad Sci*, 994: 169-174, 2003.

Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, et al. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science*, 297: 609-611, 2002.

Heisler LK, Jobst EE, Sutton GM, et al. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron*, 51: 239-249, 2006.

Henry RR, Ratner RE, Stonehouse AH, Guan X, Poon T, Malone JK, Kim DD, Kendall DM. Exenatide maintained glycemic control with associated weight reduction over 2 years in patients with type 2 diabetes. *American Diabetes Association 66th Scientific Sessions*, Washington DC; Abstract 485P, 2006.

Hernández JS, Watson RW, Wood TC, Weinshilboum RM. Sulfation of estrone and 17 beta-estradiol in human liver. Catalysis by thermostable phenol sulfotransferase and by dehydroepiandrosterone sulfotransferase. *Drug Metab Dispos*, 20 (3): 413-422, 1992.

Hervey GR. Regulation of energy balance. *Nature*, 222: 629-631, 1969.

Heshmati HM, Caplain H, Bellsle F, Mosse M, Fauveau C, Le Fur G. SR141716, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, reduces hunger, caloric intake and body weight in overweight or obese men. *Obes Res*, 9 (Suppl 3): Abs 069, 2001.

Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults. A randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA*, 282: 1568-1575, 1999.

Hill SJ, Young M. Antagonism of central histamine H₁ receptors by antipsychotic drugs. *Eur J Pharmacol*, 52: 397-399, 1978.

Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E Jr, Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, Claus TH. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol*, 266: R1371-R1382, 1994.

Hofbauer KG. Molecular pathways to obesity. *Int J Obes*, 26 (S2): S18-S27, 2002.

Hofbauer KG, Nicholson JR, Boss O. The obesity epidemic: Current and future pharmacological treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47: 565-592, 2007.

Hogan S, Fleury A, Hadvary P, et al. Studies on the antiobesity activity of tetrahydrolipstatin, a potent and selective inhibitor of pancreatic lipase. *Int J Obes*, 11: 35-42, 1987.

Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans*, 31: 1120-1124, 2003.

Horvath TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci*, 8: 561-565, 2005.

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

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

Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes in women. *N Engl J Med*, 345: 790-7, 2001.

Huang SG. Binding of fatty acids to the uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol*, 139: 1-9, 2003.

Huda MSB, Wilding JPH, Pinkney JH. Gut peptides and the regulation of appetite. *Obesity reviews*, 7: 163-182, 2006.

Hulsey MG, Pless CM, Martin RJ. ICV administration of anti-corticotropin-releasing factor antisense oligonucleotide: effects on feeding behavior and body weight. *Regul Pept*, 59: 241-246, 1995.

Ikeda H, West DB, Pustek JJ, Figlewicz DP, Reenwood MRC, Porte D, Woods SC. Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite*, 7: 381-386, 1986.

International Obesity Taskforce. <http://www.ietf.org>.

Inui A. Transgenic approach to the study of body weight regulation. *Pharmacol Rev*, 52; 1: 35-62, 2000.

Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR et al. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 338: 867-72, 1998.

Ioannides-Demos LL, Proietto J, McNeil JJ. Pharmacotherapy for Obesity. *Drugs*, 65(10):1391-1418, 2005.

Ishihara A, Kanatani A, Okada M, Hidaka M, et al. Blockade of body weight gain and plasma corticosterone levels in Zucker fatty rats using an orally active neuropeptide Y Y1 antagonist. *Br J Pharmacol*, 136:341-346, 2002.

Isidori AM, Strollo F, More M, Caprio M, Aversa A, Moretti C. Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weight. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 1954-1962, 2000.

Ito MK. The metabolic syndrome: Pathophysiology, clinical relevance, and use of niacin. *Ann.Pharmacother.* 38 (2):277-285, 2004.

Ivy AC, Oldberg E. A hormone mechanism for gallbladder contraction and avacuation. *Am J Physiol*, 86: 599-613, 1928.

Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*, 16: 303-306, 1997.

Jain AK, Kaplan RA, Gadde KM, Wadden TA, Allison DB, Brewer ER, Leadbetter RA, Richard N, Haight B, Jamerson BD, Buaron KS, Metz A. Bupropion SR vs placebo for weight loss in obese patients with depressive symptoms. *Obes Res*, 10; 7: 1049-1056, 2002.

James WPT, Astrup A, Finer N, Hilsted J, Kopelman P, Rössener S, Saris WHM, Van Gaal L. Effect of sibutramine on weight maintenance after weight loss: a randomised trial. *Lancet*, 356: 2119-2125, 2000.

Jensen MD, Caruso M, Heiling V, Miles JM. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes*, 38: 1595-1601, 1989.

Jeong S, Kim M, Han M, Lee H, Ahn J, Kim M, Song YH, Shin C, Nam KH, Kim TW, Oh GT, Yoon M. Fenofibrate prevents obesity and hypertriglyceridemia in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Metabolism*, 53: 607-613, 2004.

Jessop DJ, Dallman MF, Fleming D, Lightman SL. Resistance to glucocorticoid feedback in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 4109-4114, 2001.

Jezeq P, Engstová H, Záčková M, Vercesi AE, Costa ADT, Arruda P, Garlid KD. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1365: 319-327, 1998.

Jialal I, Stein D, Balis D, Grundy SM, Adams-Huet B, Devaraj S. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation*, 103: 1933-1935, 2001.

Johansen K. Efficacy of metformin in the treatment of NIDDM: meta-analysis. *Diabetes Care*, 22: 33-7, 1999.

Jones JR, Caul WF, Hill JO. The effects of amphetamine on body weight and energy expenditure. *Physiol Behav*, 51: 607-611, 1992.

Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 12735-12740, 2000.

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, 20: 68-100, 1999.

Kanatani A, Mashiko S, Murai N, Sugimoto N, Ito J, Fukuroda T, Fukami T, Morin N, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Saga Y, Nishimura S, Ihara M. Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology*, 141: 1011-1016, 2000.

Kappes A, Löffler G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm Metab Res*, 32: 548-554, 2000.

Katsuura G, Asakawa A, Inui A. Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides*, 23: 323-329, 2002.

Katz DL. Competing dietary claims for weight loss: finding the forest through truculent trees. *Annu Rev Public Health*, 26: 61-88, 2005.

Keesey RE. Physiological Regulation of Body Energy. Implications for Obesity. In: *Obesity: Theory and Therapy*, edited by A. J. Stunkard and T. A. Wadden, New York:Raven Press, Ltd., 1993, p. 77-96.

Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 140; 901: 578-96, 1953.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Met*, 89 (6): 2548-2556, 2004.

Kilpatrick IC, Traut M, Heal DJ. Monoamine oxidase inhibition is unlikely to be relevant to the risks associated with phentermine and fenfluramine: a comparison with their abilities to evoke monoamine release. *Int J Obesity*, 25; 10: 1454-1458, 2001.

Kim MS, Yoon CY, Park KH, Shin CS, Park KS, Kim SY, Cho BY, Lee HK. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroendocrinology*, 14: 1317-1320, 2003.

King KR. Lipostatic Control of Body Weight: Evidence of Humoral Mediation. *Physiol.Psychol.* 4 (4):405-408, 1976.

King PJ. The hypothalamus and Obesity. *Current Drug Targets*, 6:225-240, 2005.

Kinlaw WB, Marsh B. Adiponectin and HIV-lipodystrophy: taking HAART. *Endocrinology*, 145 (2): 484-486, 2004.

Kirchgessner AI, Liu M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron*, 24: 941-951, 1999.

Kirkham TC. Endocannabinoids and the regulation of ingestive behaviour. *Curr Drug Targets*, 6(2):215-223, 2005.

Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med*, 137: 25-33, 2002.

- Kjeldsen SE, Os I, Farsang C, et al. Treatment of hypertension in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Hypertens*, 18: 1345-1356, 2000.
- Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae HG, Andresen V, van der Voort IR, Veh RW, Werner CR, Klapp BF, Wiedenmann B, Wang L, Taché Y, Mönnikes H. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R751-R758, 2005.
- Koda S. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology*, 146: 2369-2375, 2005.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656-660, 1999.
- Kokkoris P, Pi-Sunyer FX. Obesity and endocrine disease. *Endocrinol Metab Clin N Am*, 32: 895-914, 2003.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*, 310: 679-683, 2005.
- Kopelman PG, Albon L. Obesity, non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Br.Med.Bull.* 53 (2):322-340, 1997.
- Kopelman P, Bryson AM, Palmer RMF. Efficacy and tolerability of ATL-962, a lipase inhibitor in obese patients. *Int J Obesity*, 28(Suppl 1):Abs O2-003, 2004.
- Kopin AS. The cholecystokinin-A receptor mediates inhibition of food intake yet is not essential for the maintenance of body weight. *J Clin Invest*, 103: 383-391, 1999.
- Koppeschaar HPF, Meinders AE, Schwarz F. Metabolic response in grossly obese subjects treated with a very-low-calorie diet with or without triiodothyronine treatment. *Int J Obes*, 7: 133-41, 1983.
- Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin – a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*, 25: 27-68, 2004.
- Korner J, Savontaus E, Chua Jr SC, Leibel RL, Wardlaw SL. Leptin regulation of AGRP and NPY mRNA in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 13: 959-966, 2001.
- Kovacs EM, Lejeune MP, Westerterp-Plantenga MS. The effects of enterostatin intake on food intake and energy expenditure. *Br J Nutr*, 90: 207-214, 2003.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS; Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393: 72-76, 1998.
- Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock, SM, Steinberg S, Ernsberger P, Jayathilake K, Meltzer HY, Roth BL. H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology*, 28: 519-526, 2003.

- Krotkiewski M. Thyroid hormones and treatment of obesity. *Int J Obes*, 24 (S2): 116-119, 2000.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*, 19: 155-157, 1998.
- Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y, Osaka CAD Study Group. Coronary artery disease. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (1): 85-89, 2003.
- Kuo JJ, Silva AA, Hall JE. Hypothalamic melanocortin receptors and chronic regulation of arterial pressure and renal function. *Hypertension*, 41: 768-774, 2003.
- Kusunoki J, Kanatani A, Moller DE. Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine*, 29 (1): 91-100, 2006.
- Ladenheim EE, Taylor JE, Coy DH, Moore KA, Moran TH. Hindbrain GRP receptor blockade antagonizes feeding suppression by peripherally administered GRP. *Am J Physiol*, 271: R180-R184, 1996.
- Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hjarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 4652-4657, 2001.
- Landgraf R. Meglitinide analogues in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs Aging*, 17: 411-25, 2000.
- Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and metabolic syndrome. *Pharmacological Research*, 53: 482-491, 2006.
- Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC, Kristensen P. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART (42-89) peptide inhibits food intake and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res*, 8: 590-596, 2000.
- Lawton CL, Wales JK, Hill AJ, Blundell JE. Serotonergic manipulation, meal-induced satiety and eating patterns: Effect of fluoxetine in obese female subjects. *Obes Res*, 3; 4: 345-356, 1995.
- Lean M, Finer N. ABC of obesity - Management: Part II - Drugs. *Br Med J*. 333; 7572:794-797, 2006.
- Lebovitz HE. α -Glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes. *Diabetes rev*, 6: 132-45, 1998.
- Lebovitz HE, Oral therapies for diabetic hyperglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 30: 909-933, 2001.

Lecklin A, Etu-Seppala P, Stark H, Tuomisto L. Effects of intracerebroventricularly infused histamine and selective H1, H2 and H3 agonists on food and water intake and urine flow in Wistar rats. *Brain Res*, 793: 279-288, 1998.

Lee CH, Olson P, Evans RM, Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*, 144: 2201-2207, 2003.

Lee MC, Schiffman SS, Pappas TN. Role of neuropeptides in the regulation of feeding behavior: a review of cholecystokinin, bombesin, neuropeptide Y, and galanin. *Neurosci Biobehav Rev*, 18: 313-323, 1994.

Lee Y, Yu X, Gonzales F, Mangelsdorf DJ, Wang MY, Richardson C, Witters LA, Unger RH. PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 11848-11853, 2002.

Le Fur S, Le Stunff C, Dos Santos C, Bougnères P. The common -866G/A polymorphism in the promoter of uncoupling protein 2 is associated with increased carbohydrate and decreased lipid oxidation in juvenile obesity. *Diabetes*, 53: 235-239, 2004.

Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med*, 332: 621-628, 1995.

Leibowitz SF. Reciprocal hunger-regulating circuits involving μ - and β -adrenergic receptors located, respectively, in the ventromedial and lateral hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 67: 1063-1070, 1970.

Leibowitz SF. Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behavior. *Fed Proc*, 45: 1396-1403, 1986.

Leibowitz SF. Hypothalamic neuropeptide Y, galanin, and amines: Concepts of coexistence in relation to feeding behavior. *Ann NY Acad Sci*, 575: 221-233, 1989.

Leibowitz SF. Differential functions of galanin cell groups in the regulation of eating and body weight. *Ann NY Acad Sci*, 863: 206-220, 1998.

Leibowitz SF, Brown LL. Histochemical and pharmacological analysis of catecholaminergic projections to the perifornical hypothalamus in relation of feeding inhibition. *Brain Res*, 201: 315-345, 1980.

Lemieux C, Picard F, Labrie F, Richard D, Deshaies Y. The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet-and ovariectomy-induced obesity. *Obes Res*, 11: 477-490, 2003.

Leonard BE. Serotonin receptors and their function in sleep, anxiety disorders and depression. *Psychother Psychosom*, 65: 66-75, 1996.

Lepor NE, Gross SB, Daley WL, Samuels BA, Rizzo MJ, Luko SP, Hickey A, Buchbinder NA, Naqvi TZ. Dose and duration of fenfluramine-phentermine therapy impacts the risk of significant valvular heart disease. *Am J Cardiol*. 86: 107-110, 2000.

Le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ, Patterson M, Borg CM, Wynne KJ, Kent A, Vincent RP, Gardiner J, Ghatei MA, Bloom SR. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology*, 147: 3-8, 2006.

Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, Dani C. Expression of ob gene in adipose-cell-regulation by insulin. *J Biol Chem*, 271: 2365-2368, 1996.

Levin BE, Triscari J, Sullivan AC. Relationship between sympathetic activity and diet-induced obesity in two rats strains. *Am J Physiol*, 245: 367-71, 1983.

Levine AS, Billington CJ. Opioid: Are they regulators of feeding? *Ann NY Acad Sci*, 575: 209-219, 1989.

Levine LR, Rosenblatt S, Bosomworth J. Use of a serotonin re-uptake inhibitor, fluoxetine, in the treatment of obesity. *Int J Obes*, 11: 185-190, 1987.

Li ZP, Hong K, Yip I, Huerta S, Bowerman S, Walker J, Wang HJ, Elashoff R, Go VLW, Heber D. Body weight loss with phentermine alone versus phentermine and fenfluramine with very-low-calorie diet in an outpatient obesity management program: A retrospective study. *Curr Ther Res*. 64; 7: 447-460, 2003.

Li HY, Hwang HW, Hu YH. Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, 323; 3: 203-206, 2002.

Li H, Matheny M, Scarpace PJ. β 3-adrenergic-mediated suppression of leptin gene expression in rats. *Am J Physiol*, 272: 031-036, 1997.

Li Z, Maglione M, Tu W, Mojica W, Arterburn D, et al. Meta-analysis: pharmacologic treatment of obesity. *Ann Intern Med*, 142: 532-546.

Li R, Serdula MK, Williamson DF, et al. Dose-effect of fenfluramine use on the severity of valvular heart disease among fen-phen patients with valvulopathy. *Int J Obes*, 23: 926-928, 1999.

Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest*, 75: 1144-1152, 1985.

Lieverse RJ, Jansen JB, Masclee AA, Lamers CB. Significant satiety effect of bombesin in lean but not in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 18: 579-583, 1994.

Liu YM, Moldes M, Bastard JP, Bruckert E, Viguerie N, Halinque B, Basdevant A, Langin D, Pairault J, Clément K. Adiponutrin: a new gene regulated by energy balance in human adipose tissue. *J Clin End*, 89: 2684-2689, 2004.

Liu YL, Toubro S, Astrup A, et al. Contribution of β 3-adrenoceptor activation to ephedrine-induced thermogenesis in humans. *Int J Obes*, 19:678-85, 1995.

Lobo MJ, Remesar X, Alemnay M. Effect of chronic intravenous injection of steroid hormones on body weight and composition of female rats. *Boichem Mol Biol Int*, 29: 349-358, 1993.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, 288: 2379-2381, 2000.

Lönnqvist F, Nordfors L, Schalling M. Leptin and its potential role in human obesity. *J Intern Med*, 245: 643-652, 1999.

López-Martí J, Díaz-Silva M, Salas A, Grasa MM, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone induces the massive loss of body weight in Zucker *fa/fa* rats fed high-energy hyperlipidic diet. *J Nutr Biochem*, 11: 530-535, 2000.

Lowell BB, Bachman ES. β -Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem*, 278 (32): 29385-29388, 2003.

Lowell BB, Flier JS. Brown adipose tissue, β_3 -adrenergic receptors, and obesity. *Annu Rev Med*, 48: 307-316, 1997.

Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou EG, Elmquist JL, Bradford F, Jeffrey S, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 107: 379-386, 2001.

Lush C, et al. A phase I study to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of rising doses of AC162352 (synthetic human PYY3-36) in lean and obese subjects. *Obes Res*, 6 (S1): Abs 0051, 2005.

Lutz TA. Pancreatic amylin as a centrally acting satiating hormone. *Curr Drug targets*, 6; 2: 181-189, 2005.

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

Maher TJ, Ulus IH, Wurtman RJ. Phentermine and other monoamine-oxidase inhibitors may increase plasma serotonin when given with fenfluramine (letter). *Lancet*, 353: 38, 1999.

Major GC, Doucet E, Trayhurn P, Astrup A, Tremblay A. Clinical significance of adaptative thermogenesis. *Int J Obes*, 31: 204-212, 2007.

Mancini HA. Treatment of obesity: an update on anti-obesity medications. *Obes Rev*, 4: 25-42, 2003.

Marimoto T, Yamamoto Y, Mobarakeh JI, Yanai K, Watanabe T, Yamatodani A. Involvement of the histaminergic system in leptin-induced suppression of food intake. *Physiol Behav*, 67: 679-683, 1999.

Marimoto T, Yamamoto Y, Yamatodani A. Brain histamine and feeding behavior. *Behav Brain Res*, 124: 145-150, 2001.

- Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Lafer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD. Response of melanocortin-4-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet*, 21: 119-122, 1999.
- Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE, Palmiter RD. Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med*, 4: 718-721, 1998.
- Martens FM, Visseren FL, Lemay J, et al. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs*, 62: 1463-1480, 2002.
- Martinez V, Barquist E, Rivier J, Taché Y. Central CRF inhibits gastric emptying of a nutrient solid meal in rats: The role of CRF₂ receptors. *Am J Physiol*, 274: G965-G970, 1998.
- Massanés RM, Grasa MM, López-Martí J, Díaz-Silva M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Zucker obese rats store less acyl-estrone than lean controls. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27 (4): 428-432, 2003.
- Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 276: 905-908, 2000.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, 3: 1029-1033, 1997.
- Matson CA, Reid DF, Cannon TA, Ritter RC. Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278: 882-890, 2000.
- Matson CA, Wiater MF, Kuijper JL, Weigle DS. Synergy between leptin and cholecystokinin (CCK) to control daily caloric intake. *Peptides*, 18: 1275-1278, 1997.
- Maulon-Feraille L, Della Zuana O, Suply T, Rovere-Jovene C, Audinot V, Levens N, Boutin JA, Dahault J, Nahon JL. Appetite-boosting property of pro-melanin-concentrating hormone (131-165) (neuropeptide-glutamic acid-isoleucine) is associated with proteolytic resistance. *J Pharmacol exp Ther*, 302; 2: 766-773, 2002.
- Mayer J. Glucostatic Mechanism of Regulation of Food Intake. *N Engl J Med*. 249: 13-16, 1953.
- McGarry J, Woeltje K, Kuwajima M, Foster D. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev*, 5: 271-284, 1989.
- McLaughlin PJ, Winston K, Swezey L, Wisniecki A, Aberman J, Tardiff DJ, et al. The cannabinoid CB1 antagonists SR 141716A and AM 251 suppress food intake and food-reinforced behaviour in a variety of tasks in rats. *Behav Pharmacol*, 14: 583-588, 2003.
- McTigue DM, Rogers RC. Pancreatic polypeptide stimulates gastric motility through a vagal-dependent mechanism in rats. *Neurosci Lett*, 188: 93-96, 1995.

Meeran K, O'Shea D, Edwards CM, Turton MD, Heath MM, Gunn I, Abusnana S, Rossi M, Small CJ, Goldstone AP, Taylor GM, Sunter D, Steere J, Choi SJ, Ghatei MA, Bloom SR. Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*, 140: 244-250, 1999.

Meier JJ, Nauck MA, Schmidt WE, Gallwitz B. Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited. *Regul Pept*, 107: 1-13, 2002.

Melia AT, Koss-Twardy SG, Zhi J. The effect of orlistat, an inhibitor of dietary fat absorption, on the absorption of vitamins A and E in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 36: 647-53, 1996.

Mercer JG, Moar KM, Rayner DV, Trayhurn P, Hoggard N. Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold-exposed lean mice. *FEBS Lett*, 402: 185-188, 1997.

Miltenberger Rj, Mynatt RL, Wilkinson JE, Woychik RP. The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome. *J Nutr*, 127: 1902S-1907S, 1997.

Moesgaard S, Ahrén B, Carr RD, Gram DX, Brand CL, Sundler F. Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expression in the mouse stomach. *Reg Pep*, 120: 261-267, 2004.

Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: A clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med*. 56:45-62, 2005.

Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Tsuruta T, Kangawa K, Nakazato M. Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regulatory Peptides*, 126: 55-59, 2005.

Montague CT. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387: 903-908, 1997.

Moore R, Grant AM, Howard AN, Mills IH. Treatment of obesity with triiodothyronine and very-low-calorie diet. *Lancet*, 1:223-6, 1980.

Moran TH. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition*, 16: 858-856, 2000.

Moran TH, McHugh PR. Cholecystokinin suppresses food intake by inhibiting gastric emptying. *Am J Physiol*, 242: R491-R497, 1982.

Morris MJ, Nguyen T. Does neuropeptide Y contribute to the anorectic action of amylin? *Peptides*, 22: 541-546, 2001.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443: 289-295, 2006.

- Müller G, Jordan H, Petry S, Wetekam EM, Schindler P. Analysis of lipid metabolism in adipocytes using a fluorescent fatty acid derivivate. Insulin stimulation of lipogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1347: 23-39, 1997.
- Mullins D, Kirby D, Hwa J; Guzzi M, Rivier J, Parker E. Identification of potent and selective neuropeptide Y Y(1) receptor agonists with orexigenic activity in vivo. *Mol Pharmacol*, 60: 534-540, 2001.
- Muls E, Van Gaal L, Autier P, Vansant G. Effects of initial BMI and on-treatment weight change on the lipid-lowering efficacy of fibrates. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21: 155-158, 1997.
- Mundingier TO, Cummings DE, Taborsky GJ. Direct stimulation of ghrelin secretion by sympathetic nerves. *Endocrinology*, 147: 2893-2901, 2006.
- Munger R, Bückert A, Jéquier E, Felber JP. Thermogenic effect of the new β -adrenoreceptor agonist Ro 40-2148 in healthy male volunteers. *Diabetes*, 39 (Suppl 1):284, 1990.
- Nagase I, Yoshida T, Kumamoto K, Umekawa T, Sakane N, Nikami H, et al. Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white adipose tissue of obese mice treated with thermogenic β_3 -adrenergic agonist. *J Clin Invest*, 97: 2898-2904, 1996.
- Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. Appetite regulation: from gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol*, 60: 153-160, 2004.
- Nedergaard J, Cannon B. The novel uncoupling proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp Physiol*, 88: 65-84, 2003.
- Nelson DL, Gehlert DR. Central nervous system biogenic amine targets for control of appetite and energy expenditure. *Endocrine*, 29; 1: 49-60, 2006.
- Nesto R. C-reactive protein, its role in inflammation, type 2 diabetes and cardiovascular disease, and the effects of insulin-sensitizing treatment with thiazolidinediones. *Diabet Med*, 21: 810-817, 2004.
- Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*, 64: 1-64, 1984.
- Niimi M. The role of anorectic and orexigenic peptides (CART, NPY, etc). *Nippon Rinsho*, 59; 3: 443-448, 2001.
- Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology*, 136: 2143-2149, 1995.
- Nonogaki K, Strack AM, Dallman MF, Tecott LH. Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene. *Nat Med*, 4: 1152-1156, 1998.
- Nordheim U, Nicholson JR, Dokladny K, Dunant P, Hofbauer KG. Cardiovascular responses to melanocortin 4-receptor stimulation in conscious unrestrained normotensive rats. *Peptides*, 27: 438-443, 2006.

Norman RJ, Flight IH, Rees MC. Oestrogen and progestogen hormone replacement therapy for perimenopausal and post-menopausal women: weight and body fat distribution. *Cochrane Database Syst Rev*, 2: CD001018, 2000.

Nowak KW, Mackowiak P, Switonska MM, Fabis M, Malendowicz LK. Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci*, 66: 449-454, 2000.

O'Hara P, Connet JE, Lee WW, Nides M, Murray R, Wise R. Early and late weight gain following smoking cessation in the Lung Health Study. *Am. J. Epidemiol*, 148:821-830, 1998.

Okada S, York DA, Bray GA, Mei J, Erlanson-Albertsson C. Differential inhibition of fat intake in two strains of rat by the peptide enterostatin. *Am J Physiol*, 262: R1111-R1116, 1992.

Oliver WR et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 15924-15929, 2003.

Oltmans G. Norepinephrine and dopamine levels in hypothalamic nuclei of the genetically obese mouse (ob/ob). *Brain Res*, 273: 369-373, 1983.

Onai T, Kilroy G, York DA, Bray GA. Regulation of β_3 -adrenergic receptor mRNA by sympathetic nerves and glucocorticoids in BAT of Zucker obese rats. *American Journal of Physiology*, 269: 519-526, 1995.

Oommen KJ. Zonisamide: a new antiepileptic drug. *Clin Neuropharmacol*, 22:192-200, 1999.

O'Rahilly S, Yeo GS, Farooqi IS. Melanocortin receptors weigh in. *Nat Med*, 10: 351-352, 2004.

Ostlund RE, Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 3909-3913, 1996.

Padwal R, Li SK, Lau DCW. Long-term pharmacotherapy for overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Int J Obes*, 27: 1437-1446, 2003.

Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*, 27: 73-100, 2006.

Pahuja SL, Hochberg RB. A comparison of the fatty acid esters of estradiol and corticosterone synthesized by tissues of the rat. *J Biol Chem*, 264: 3216-3222, 1989.

Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem*, 279: 12152-12162, 2004.

Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*, 46: 983-988, 1997.

Paolisso G, Amato L, Eccellente R, et al. Effect of metformin on food intake in obese subjects. *Eur J Clin Invest*, 28: 441-6, 1998.

Papanicolaou DA, Petrides JS, Tsigos C, Bina S, Kalogeras KT, Wilder R, Gold PW, Deuster PA, Chrousos GP. Exercise stimulates interleukin-6 secretion: inhibition by glucocorticoids and correlation with catecholamines. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 271: 601-605, 1996.

Parham ES. The interaction of eating restraint and stressful life events on womens weight and weight changes. *Nutr Res*, 10: 831-835, 1990.

Pearson TA, Blair SN, Daniels Sr, et al. AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerotic Vascular Diseases. American Heart Association Science Advisory and Coordinating Committee. *Circulation*, 106: 388-391, 2002.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107: 499-511, 2003.

Pedrazzini T, Seydoux J, Konstner P, Aubert J, Grouzmann E, Beerman F, Brunner H. Cardiovascular response, feeding behaviour and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat Med*, 4: 722-726, 1998.

Peinado-Onsurbe J, Blay MT, Casadomé L, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of 24-h food deprivation on lipoprotein composition and oleoyl-estrone content of lean and obese Zucker rats. *Eur J Nutr*, 40: 155-160, 2001.

Peptimmune. GT 389-255 novel conjugate. *Company Website*, March 10, 2005.

Pereira JL, López-Pardo F, Parejo J, et al. Study of heart valve function on obese patients treated with sibutramine. *Med Clin*, 118: 57-9, 2002.

Phillips RJ, Powley TL. Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake. *Am J Physiol*, 271: R766-R769, 1996.

Pi-Sunyer, FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: Rio-North America: a randomized controlled trial. *JAMA*, 296: 761-775, 2006.

Pico C, Oliver P, Sanchez J, Palou A. Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. *Br J Nutr*, 90: 735-741, 2003.

Pieber TR, Roitelman J, Lee Y, Luskey KL, Stein DT. Direct plasma radioimmunoassay for rat amylin (1-37): concentrations with acquired and genetic obesity. *Am J Physiol*, 267: 156-164, 1994.

Pietri-Rouxel F, Strosberg AD. Pharmacological characteristics and species-related variations of b3-adrenergic receptors. *Fundam Clin Pharmacol*, 9: 211-218, 1995.

Pinto S, Roseberry AG, Liu H, diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*, 304: 110-115, 2004.

Piomelli D. The endocannabinoid system: A drug discovery perspective. *Curr Opin Invest Drugs*, 6(7): 672-679, 2005.

Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, et al. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabet Obes Metab*, 7: 65-72, 2005.

Poppitt SD. Energy density of diets and obesity. *Int J Obesity* 19 (Suppl. 5): S20-S26, 1995.

Posadas MD, Olguin MC, Zingale MI, Revelant G, Labourdette V, Gayol MD, Calderari S. Oleoyl-estrone metabolic effects in relation with caloric restriction in inbred beta rats with spontaneous obesity and type 2 diabetes. *Medicina-Buenos Aires* 64 (4): 332-336, 2004.

Powell DR. Obesity drugs and their targets: correlation of mouse knockout phenotypes with drug effects in vivo. *Obesity reviews*, 7: 89-108, 2006.

Powley TL, Phillips RJ. Gastric satiation is volumetric, intestinal satiation is nutritive. *Physiol Behav*, 82: 69-74, 2004.

Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes*, 46 (12): 1939-1944, 1997.

Pritchard LE, Turnbull AV, White A. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol*, 172; 3: 411-421, 2002.

Proietto J, Thorburn AW. The therapeutic potential of leptin. *Expert Opin Investig Drugs*, 12: 373-8, 2003.

Prow MR, Lancashire B, Aspley S, Heal DJ, Kilpatrick IC. Additive effects on rat brain 5HT release of combining phentermine with dexfenfluramine. *Int J Obesity* 25: 1450-1453, 2001.

Puerta M. El tejido adiposo pardo como amortiguador energético. *Nutrición y Obesidad*, 4: 112-121, 2001.

Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*, 10: 524-529, 2004.

Qian H, Hausman DB, Compton MM, Martin RJ, Della-Fera MA, Hartzell DL, Baile CA. TNFalpha induces and insulin inhibits caspase 3-dependent adipocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 284 (5): 1176-1183, 2001.

Qin X, Tso P. The role of apolipoprotein A-IV in the control of food intake. *Curr Drug Targets*, 6: 145-151, 2005.

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380: 243-247, 1996.

Quetelet LA. *Physique social*. C Murquardt, Bruxelles, vol 2: 92, 1969.

Rafecas I, Esteve M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Deposition of dietary fatty acids in young lean and obese Zucker rats fed a cafeteria diet. *Int J Obes*, 16: 775-787, 1992.

Rangwala SM, Lazar MA. Transcriptional control of adipogenesis. *Ann Rev Nutr*, 20: 535-539, 2000.

Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* (Silver Spring) 14: 529-644, 2006.

Rask E, Olsson T, Söderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johanson O, et al. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1418-1421, 2001.

Rask E, Walker BR, Söderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johanson O, et al. Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3330-3336, 2002.

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*, 12; 295(7): 349-53, 1976.

Raynor HA, Niemeier HM, Wing RR. Effect of limiting snack food variety on long-term sensory-specific satiety and monotony during obesity treatment. *Eat Behav*, 7: 1-14, 2006.

Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37: 1595-1607, 1988.

Rehfeld JF. A centenary of gastrointestinal endocrinology. *Horm Metab Res*, 36: 735-741, 2004.

Remesar X, Fernández-López JA, Alemany M. Steroid hormones and the control of body weight. *Med Res Rev*, 13 (5): 623-631, 1993.

Remesar X, Fernández-López JA, Blay MT, Savall P, Salas A, Díaz-Silva M, Esteve M, Grasa MM, Alemany M. Effect of oral oleoyl-estrone on adipose tissue composition in male rats. *Int J Obesity*, 26 (8): 1092-1102, 2002.

Remesar X, Guijarro P, Torregrosa C, Grasa MM, López J, Fernández-López JA, Alemany M. Oral oleoyl-estrone induces the rapid loss of body fat in Zucker lean rats fed a hyperlipidic diet. *Int J Obesity*, 24: 405-1412, 2000.

Remesar X, Tang V, Ferrer E, Torregrosa C, Virgili J, Masanés RM, Fernández-López JA, Alemany M. Estrone in food: a factor influencing the development of obesity? *Eur J Nutr*, 38: 247-253, 1999.

Ricardo JA, Koh ET. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res*, 153: 1-26, 1978.

Rich S, Shillington A, McLaughlin V. Comparison of survival in patients with pulmonary hypertension associated with fenfluramine to patients with primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*, 92: 1366-1368, 2003.

- Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*, 345:161-179, 2000.
- Riddle MC. Pramlintide: an agent for glycemic control plus weight control. *Diabetes Technol Ther*, 4: 63-65, 2002.
- Riediger T, Traebert M, Schmid HA, Scheel C, Lutz TA, Sharrer E. Site-specific effects of ghrelin on the neural activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett*, 341: 151-155, 2003.
- Riedy CA, Chavez M, Figlewicz DP, Woods SC. Central insulin enhances sensitivity to cholecystokinin. *Physiol Behav*, 58: 755-760, 1995.
- Rieusset J, Touri F, Michalik L, Escher P, Desvergne B, Niesor E, Wahli W. A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol*, 16: 2628-2644, 2002.
- Ritter S, Dinh T, Friedman M. Induction of Fos-like immunoreactivity (Fos-li) and stimulation of feeding by 2,5-anhydro-D-mannitol (2,5-AM) require the vagus nerve. *Brain Res*, 646: 53-64, 1994.
- Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JC, Blundell JE. Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides*, 36; 5: 303-325, 2002.
- Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 414: 209-212, 2001.
- Rolfe DF, Brand MD. Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am J Physiol*, 271: 1380-1389, 1996.
- Rolls BJ. The role of energy density in the overconsumption of fat. *J Nutr*, 130: 268S-271S, 2000.
- Rolls BJ, Pirraglia PA, Jones MB, Peters JC. Effects of olestra, a noncaloric fat substitute, on daily energy and fat intakes in lean men. *Am J Clin Nutr*, 56: 84-92, 1992.
- Romero MM, Grasa MM, Fernández-López JA, Esteve M, Alemany M. Semiquantitative RT-PCR measurement of gene expression in rat tissues including a correction for varying cell size and number. *Nutr Metab* (In the press).
- Romero Ramos H, Martínez Brocca MA, Pereira Cunill JL, García Luna PP. Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Rev Esp Obes*. 3; 1:13-25, 2005.
- Rosenbaum M, et al. Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *J Clin Invest*, 115: 3579-3586, 2005.
- Rosmond R. The glucocorticoid receptor gene and its association to metabolic syndrome. *Obes Res*, 10: 1078-1086, 2002.

Ross MG, Desai M. Gestational programming: population survival effects of drought and famine during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: 25-33, 2005.

Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA, Bloom SR. A C-terminal fragment of agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of α -melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*, 139: 4428-4431, 1998.

Rothman RB, Baumann MH. Neurochemical mechanisms of phentermine and fenfluramine: Therapeutic and adverse effects. *Drug Develop Res*. 51: 52-65, 2000.

Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, 281: 31-35, 1979.

Rothwell NJ, Stock MJ. Insulin and thermogenesis, *Int J Obes*, 12: 93-102, 1988.

Rowland NE, Marshall M, Roth JD. Comparison of either norepinephrine-uptake inhibitors or phentermine combined with serotonergic agents on food intake in rats. *Psychopharmacol*. 149: 77-83, 2000.

Roy J, Levejoy J, Windhauser MM, Bray GA. Metabolic effects of fat substitution with olestra. *FASEB J*, 11: 358A, 1995.

Rushing PA, Hagan MM, Seeley RJ, Lutz TE, Woods SC. Amylin: a novel action in the brain to reduce body weight. *Endocrinology*, 141: 850-853, 2000.

Sachdev M, Miller WC, Ryan T, Jolis JG. Effects of fenfluramine-derivative diet pills on cardiac valves: a meta-analysis of observational studies. *Am Heart J*, 144: 1065-1073, 2002.

Sahu A. Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology*, 139: 795-798, 1998.

Sahu A, Carray RE, Wang YP. Evidence that neurotensin mediates the central effect of leptin on food intake in rat. *Brain Res*, 888: 343-347, 2001.

Sakata T, Kurokawa M, Oohara A, Yoshimatsu H. A physiological role of brain histamine during energy deficiency. *Brain Res Bull*, 35: 135-139, 1994.

Sakata I, Tanaka T, Yamazaki M, Tanizaki T, Zheng Z, Sakai T. Gastric estrogen directly induces ghrelin expression and production in the rat stomach. *Journal of Endocrinology*, 190: 749-757, 2006.

Sakurai T. Role of orexin in regulation of energy homeostasis. *Curr Med Chem. Central Nervous System Agents*, 3; 3: 229-241, 2003.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA,

Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92: 573-585, 1998.

Sakurai T, Moriguchi T, Furuya K, Kajiwara N, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K. Structure and function of human prepro-orexin gene. *J Biol Chem*, 274: 17771-17776, 1999.

Salas A, Esteve M, Remesar X. Oleoyl-estrone treatment activates apoptotic mechanisms in white adipose tissue. *Life Sci*, 80 (4): 293-298, 2007.

Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B y Grupo Colaborativo de la SEEDO. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)*, 128; 5: 184-196, 2007.

Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes*, 45: 1661-1669, 1996.

Samanin R, Garattini S. Neurochemical mechanism of action of anorectic drugs. *Pharmacol Toxicol*, 73: 63-68, 1993.

Sanchez C, Hyttel J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol*, 19: 467-489, 1999.

Sánchez J, Oliver P, Palou A, Picó C. The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology*, 145: 5049-5055, 2004.

Sanchis D, Adán C, Ardévol A, Grasa MM, Cabot C, Balada F, Vilà R, Estruch J, Puerta M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Short-term treatment with oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) strongly reduces the expression of the ob gene in young rats. *Biochem J*, 326: 357-360, 1997b.

Sanchis D, Balada F, Farrerons C, Virgili J, Grasa MM, Adán C, Esteve M, Cabot C, Ardévol A, Vilà R, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Structural determinants of oleoyl-estrone slimming effects. *Life Sci*, 62: 1349-1359, 1998.

Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Monserrat C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Short-term handling of the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) by the rat. *Mol Cell Biochem*, 177: 153-157, 1997c.

Sanchis D, Balada F, Grasa MM, Virgili J, Peinado J, Montserrat C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Oleoyl-estrone induces the loss of body fat in rats. *Int J Obes* 20: 588-594, 1996.

Sanchis D, Balada F, Picó C, Grasa MM, Virgili J, Farrerons C, Palou A, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Rats receiving the slimming agent oleoyl-estrone in liposomes (Merlin-2) decrease food intake but maintain thermogenesis. *Arch Physiol Biochem*, 105; 7: 663-672, 1997a.

Sapolsky R, Romero M, Munck A. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr Rev*, 21: 55-89, 2000.

- Sarika Arora A. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – a review. *Neuropeptides*, 40: 375-401, 2006.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Masuzaki H, Yoshimasa Y. Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. *Neurosci Lett*, 249: 107-110, 1998.
- Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Tymer N, Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol*, 273: 226-230, 1997.
- Scharf MT, Ahima RS. Gut peptides and other regulators in obesity. *Seminars in liver disease*, 24; 4: 335-347, 2004.
- Scheen AJ. Insulin therapy in the treatment of NIDDM. *IDF Bull*, 41: 16-8, 1996.
- Scheen AJ. Current management strategies for coexisting diabetes mellitus and obesity. *Drugs*, 63; 12: 1165-1184, 2003.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 270: 26746-26749, 1995.
- Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. Oxyntomodulin from distal gut. Role in regulation of gastric and pancreatic functions. *Dig Dis Sci*, 34: 1411-1419, 1989.
- Schwartz MW. Staying slim with insulin in mind. *Science*, 289: 2066-2067, 2000.
- Schwartz MW, Dallman MF, Woods SC. Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *Am J Physiol*, 269: R949-R957, 1995.
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte DJ. Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev*, 13: 387-414, 1992.
- Schwartz MW, Niswender KD. Adiposity signaling and biological defense against weight gain: Absence of protection or central hormone resistance? *J Clin Endocrinol Meta*, 89; 12: 5889-5897, 2004.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, 46: 2119-2123, 1997.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404: 661-671, 2000.
- Segal KR, Presta E, Gutin B. Thermic effect of food during graded exercise in normal weight and obese men. *Am J Clin Nutr*, 40: 995-1000, 1984.
- Serrano-Muñoz M, Grasa MM, González-Martínez D, Cabot C, Fernández-López JA, Alemany M. Intestinal oleoil-estrone esterase activity in the Wistar rat. *Journal of Endocrinological Investigation* (in press).

Shacham S, Marantz Y, Senderowitz H, et al. Novel 5-HT₆ receptor antagonists for the treatment of obesity. *Obes Res*, 13: A192, 2005.

Shadid S, Jense MD. Effects of human growth hormone administration in human obesity. *Obes Res*, 11(2):170-175, 2003.

Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *Journal Biol Chem*, 274: 35832-35839, 1999.

Shimazu T, Noma M, Saito M. Chronic infusion of norepinephrine into the ventromedial hypothalamus induces obesity in rats. *Brain Res* 369: 215-223, 1986.

Shimizu H, Tsuchiya T, Sato N et al. Troglitazone reduces plasma leptin concentrations but increases hunger in NIDDM patients. *Diabetes Care*, 21: 1470-4, 1998.

ShklyaeV S. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 : 14217-14222, 2003.

Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*, 45 : 277-282, 1987.

Silva JE. The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann Intern Med*, 139 : 205-213, 2003.

Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*, 86 : 435-464, 2006.

Silver AJ, Morley JE. Role of CCK in regulation of food intake. *Prog Neurobiol*, 36 : 23-34, 1991.

Simpson ER, Graham-Lorence S, Hollub AJ, Merrill JC, Mendelson CR. Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells. *Endocr Rev*, 10 : 136-148, 1989.

Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagic and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*, 44 : 147-151, 1995.

Sjövall J. Fifty years with bile acids and steroids in health and disease. *Lipids*, 39 : 703-722, 2004.

Smagin GN, Howell LA, Ryan DH, De Souza EB, Harris RB. The role of CRF₂ receptors in corticotropin-releasing factor- and urocortin-induced anorexia. *Neuroreport* 9; 7: 1601-1606, 1998.

Smith GP. Satiety : from gut to brain. *Oxford University Press*, 291, 1998.

Smith EM, Blalock JE. Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances : association with leukocyte interferon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 : 7530-7534, 1981.

Smith GP, Jerome C, Cushman BJ, Eterno R, Simansky KJ. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science*, 213 : 1036-1037, 1981.

Smith S, Prosser W, Donahue D, Anderson C, Shanahan W. ADP356, an orally-active selective 5HTC agonist, reduces body weight in obese adult men and women, *American Diabetes Association*, 2006.

Snyder EE, Walts B, Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes. Res.*,12:369-439, 2004.

Sonti G, Ilyn SE, Plata-Salaman CR. Anorexia induced by cytokine interactions at pathophysiological concentrations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 270: 1394-1402, 1996.

Sörensen TI, Price RA, Stunkard AJ, Schulsinger F. Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings. *Br Med J*, 298: 87-90, 1989.

Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 47: 507-14, 1998.

Stanley BG, Hoebel BG, Leibowitz SF. Neurotensin: Effects of hypothalamic and intravenous injections on eating and drinking in rats. *Peptides*, 4: 493-500, 1983.

Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*, 7: 1189-1192, 1986.

Stein LJ, Woods SC. Gastrin releasing peptide reduces meal size in rats. *Peptides*, 3: 833-835, 1982.

Stellar E. The physiology of motivation. *Psychol Rev*, 61; 5, 1954.

Ste Marie L, Miura GI, Marsh DJ, Yagaloff K, Palmiter RD. A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 12339-12344, 2000.

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

Stirling JL, Stock MJ. Metabolic origins of thermogenesis induced by diet. *Nature*, 220:801-2, 1968.

Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO. Evidence for the involvement of interleukin-6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest*, 89: 1681-1684, 1992.

Stunkard AJ, Sorensen TIA, Harris C et al. An adoption study of human obesity. *N Eng j Med*, 314: 193-198, 1986.

Sugino T, Yamaura J, Yamagishi M, Ogura A, Hayashi R, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y. A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. *Biochem Biophys Res Commun*, 298: 785-788, 2002.

Susulic VS, Frederich RC, Lawitts J, Tozzo E, et al. Targeted disruption of beta 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*, 270:29483-29494, 1995.

Takahashi KA, Cone RD. Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide γ /Agouti-related protein neurons. *Endocrinology*, 146: 1043-1047, 2005.

Takamura T, Nohara E, Nagai Y, Kobayashi K. Stage-specific effects of thiazolidinedione on proliferation, differentiation and PPAR γ mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol*, 422: 23-29, 2001.

Tang V, Torregrosa C, Remesar X, Alemany M. Dietary oleoyl-estrone delays the growth rate of young rats. *Eur J Nutr*, 40: 17-22, 2001.

Tao R, Fray A, Aspley S, Bramme Rr, Heal D, Auerbach S. Effects on serotonin in rat hypothalamus of D-fenfluramine, aminorex, phentermine and fluoxetine. *Eur.J.Pharmacol.* 445 (1-2):69-81, 2002.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R. Identification and expression cloning of a leptin receptor, Ob-R. *Cell*, 83: 1263-1271, 1995.

Taylor JE, Richelson E. High affinity binding of tricyclic antidepressants to histamine H1-receptors: fact and artifact. *Eur J Pharmacol*, 67: 41-46, 1980.

Tébar Massó FJ, Garaulet Aza M, García Prieto MD. Regulación del apetito: nuevos conceptos. *Rev Esp Obes*, 1: 13-20, 2003.

Tecott LH, Sun LM, Akana SF, Strack AM, Lowenstein DH, Dallman MF, Julius D. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT $_2c$ serotonin receptors. *Nature*, 374: 542-546, 1995.

Ter Host GJ, de Boer P, Luiten PG, van Willigen JD. Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience*, 31: 785-797, 1989.

Thompson ME, Cox VC. The effects of estradiol on body weight and food intake in normal weight VMH-lesioned rats. *Physiol Behav*, 22: 627-629, 1979.

Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, 145: 234-242, 2004.

Thornton-Jones ZD, Vickers SP, Clifton PG. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A reduces appetitive and consummatory responses for food. *Psychopharmacology*, 179: 452-460, 2005.

Tobin JF, Freedman LP. Nuclear receptors as drug targets in metabolic diseases: new approaches to therapy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 17(7):284-290, 2006.

Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CC, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 16309-16313, 2002.

- Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*, 144: 1506-1512, 2003.
- Travers S, Norgren R. Gustatory neural processing in the hindbrain. *Annu Rev Neurosci*, 10: 595-632, 1987.
- Trayhurn P, Bing C. Appetite and energy balance signals from adipocytes. *Phil Trans R Soc B*, published online, 2006.
- Trayhurn P, Jones PM, McGuckin MM, Goodbody AE. Effects of overfeeding on energy balance and brown fat thermogenesis in obese (ob/ob) mice. *Nature*, 295: 323-325, 1982.
- Trayhurn P, Thomas MEA, Duncan JS, Rayner DV. Effects of fasting and refeeding on ob gene-expression in white adipose-tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett*, 368: 488-490, 1995.
- Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochemical Society Transactions*, 33 (5): 1078-1081, 2005.
- Tritos NA, Elmquist JK, Mastaitis JW, Flier JS, Maratos-Flier E. Characterization of expression of hypothalamic appetite-regulating peptides in obese hyperleptinemic brown adipose tissue-deficient (uncoupling protein-promoter-driven diphtheria toxin A) mice. *Endocrinology*, 139: 4634-4641, 1998.
- Tritos NA, Mantzoros CS. Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia*, 40: 1371-1379, 1997.
- Trocho C, Pardo R, Rafecas I, et al. Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. *Life Sci*, 63: 337-349, 1998.
- Tsai AG, Wadden TA. Systematic review: an evaluation of major commercial weight loss programs in the United States. *Ann Intern Med*, 142: 532-546, 2005.
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407: 908-913, 2000.
- Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*, 24: RC19-RC21, 2001.
- Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 50: 707-709, 2001.
- Tso P, Sun W, Liu M. Gastrointestinal satiety signals IV. Apolipoprotein A-IV. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286: G885-G890, 2004.
- Tsujii S, Bray GA. Food intake of lean and obese Zucker rats following ventricular infusions of adrenergic agonists. *Brain Res*, 587: 226-232, 1992.
- Tuomilehto J, Lindström J, Ericksson JG, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*, 344:1343-50, 2001.

Turnbull AV, Rivier C. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc Soc Exp Biol Med*, 215: 1-10, 1997.

Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS, Cooney GJ. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes*, 56 (8): 2085-92, 2007.

Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith Dm, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379: 69-72, 1996.

UK prospective diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 352:837-53, 1998.

Ulus IH, Maher TJ, Wurtman RJ. Characterization of phentermine and related compounds as monoamine oxidase (MAO) inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 59: 1611-1621, 2000.

Unwin N. The metabolic syndrome. *J Roy Soc Med*, 99; 9: 457-462, 2006.

Ur E, Wilkinson M. Endocrine and neuroendocrine signals of energy stores: view from the chair. *Int J Obesity* 25; 5 : S30-S34, 2001.

Vaisse C, Clement K, Durand E, Hereberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest*, 106: 253-62, 2000.

Van Dielen FM, Buurman WA, Hadfoune M, Nijhuis J, Greve JW. Macrophage inhibitory factor, plasminogen activator inhibitor-1, other acute phase proteins, and inflammatory mediators normalize as a result of weight loss in morbidly obese subjects treated with gastric restrictive surgery. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 4062-4068, 2004.

Van Gaal LF, Rissanen AM, Schen AJ, Ziegler O, Rössner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*, 365: 1389-1397, 2005.

Van Gaal LF, Wauters MA, Peiffer FW, de Leeuw IH. Sibutramine and fat distribution: is there a role for pharmacotherapy in abdominal/visceral fat reduction? *Int J Obesity*, 22 (S1): 38-40, 1998.

Vanhoutte PM, Saxena PR, Paoletti R, Brunello N, Jackson N, Jackson AS. Serotonin: From cell biology to pharmacology and therapeutics. *Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands*, 1993.

Van Itallie TB. The Glucostatic Theory 1953-1988: Roots and Branches. *Int J Obesity*, 14 (suppl 3): 1-10, 1990.

Vasselli JR, Currie PJ, Lukic T, Harris AG. Centrally-injected oleoyl-estrone reduces feeding and body weight in rats. *Diabetologia* 50 (Suppl 1): S22. Abstract 0039, 2007.

Verdich C, Flint A, Gutzwiller JP, Naslund E, Beglinger C, Hellstrom PM, Long SJ, Morgan LM, Holst JJ, Astrup A. A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(9): 4382-4389, 2001.

Verty AN, McFarlane JR, McGregor IS, Mallet PE. Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and melanocortin MCR-4 receptors in regulating food intake. *Endocrinology*, 145: 3224-3231, 2004.

Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 1313-1316, 1997.

Vickers SP, Kennett GA. Cannabinoids and the regulation of ingestive behavior. *Curr Drug Targets*, 6 (2): 215-223, 2005.

Vilà R, Adán C, Grasa MM, Massanés RM, Esteve M, Cabot C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of food deprivation on rat plasma estrone fatty acid esters. *Diabetes Obes Metab*, 1 (6): 353-356, 1999.

Virgili J, Casals I, Peinado-Onsurbe J, Esteve M, Julve Gil J, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Distribution of oleoyl-estrone in rat plasma lipoproteins. *Horm Metabol Res*, 31: 597-601, 1999.

Voigt JP, Schade R, Fink H, Hörtnagl H. Role of 5-HT_{1A} receptors in the control of food intake in obese Zucker rats of different ages. *Pharmacol Biochem Behav*, 72: 403-409, 2002.

Volmar KE, Hutchins GM. Aortic and mitral fenfluramine-phentermine valvulopathy in 64 patients treated with anorectic agents. *Arch Pathol Lab Med*. 125 (12): 1555-1561, 2001.

Wadden T, et al. Pramlintide treatment in obesity elicited progressive weight loss when used with a structured lifestyle intervention program: a randomized controlled trial. International Congress on Obesity, Sydney, Australia, 2006.

Wadden TA, Bartlett SJ, Foster GD, Greenstein RA, Wingate BJ, Stunkard AJ, et al. Sertraline and relapse prevention training following treatment by very-low-calorie diet: a controlled clinical trial. *Obes Res*, 3: 549-57, 1995.

Wade GN, Heller HW. Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. *Am J Physiol*, 264: 1219-1223, 1993.

Wagner JA, Hu K, Bauersachs J, Karcher J, Wiesler M, et al. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 38: 2048-2054, 2001.

Wahlestedt C, Reis DJ. Neuropeptide Y-related peptides & their receptors: Are the receptors potential therapeutic drug targets? *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 32: 309-352, 1993.

Walder K, Norman RA, Hanson RL, Schrauwen P, Neverova M, Jenkinson CP, et al. Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima Indians. *Hum Mol Genet*, 7: 1431-1435, 1998.

Wang YX, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptordelta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 113: 159-170, 2003.

Wang YX, et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*, 2: 294, 2004.

Wang L, Saint-Pierre DH, Taché Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, 325: 47-51, 2002.

Wang MY, Orci L, Ravazzola M, Unger RH. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 18011-18016, 2005.

Warne JP. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol*, 177 (3): 351-355, 2003.

Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by PPAR γ agonists. *J Biol Chem*, 2001.

Weigle DS. Pharmacological therapy of obesity: Past, present and future. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 2462-2469, 2003.

Weingarten S, Savoldelli D, Langhans W. Enhancement or loss of the hypophagic effect of interleukin-1 upon chronic administration. *Physiol Behav*, 52: 831-837, 1992.

Weintraub M, Hasday JD, Mushlin AI, Lockwood DH. A double-blind clinical trial in weight control. Use of fenfluramine and phentermine alone and in combination. *Arch Intern Med*. 144: 1143-1148, 1984.

Weintraub M, Sundaresan PR, Madan M, Schuster B, Balder A, Lasagna L, Cox C. Long-term weight control study I (weeks 0 to 34). The enhancement of behavior modification, caloric restriction, and exercise by fenfluramine plus phentermine versus placebo. *Clin Pharmacol Ther*. 51: 586-594, 1992.

Weintraub M, Sundaresan PR, Schuster M, Moscucci M, Stein EC. Long-term weight control study III (weeks 104 to 156). An open-label study of dose adjustment of gifenfluramine and phentermine. *Clin Pharmacol Ther*. 51: 602-607, 1992.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AWJr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112: 1796-1808, 2003.

Wellman PJ, Jones SL, Miller DK. Effects of preexposure to dexfenfluramine, phentermine, dexfenfluramine-phentennine, or fluoxetine on sibutramine-induced hypophagia in the adult rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 75; 1: 103-114, 2003.

Wellman PJ, Maher TJ. Synergistic interactions between fenfluramine and phentermine. *Int J Obesity*, 23: 723-732, 1999.

Wenger T, Moldrich G. The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins leukot. Essent. Fatty Acids*, 66 (2-3): 301-307, 2002.

Wessells H, Blevins JE, Vanderah TW. Melanocortinergic control of penile erection. *Peptides*, 26: 1972-1977, 2005.

West DB. Genetics of obesity in humans and animal models. *Endocrinol Metabol Clin North Am*. 25: 801-813, 1996.

Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci*, 38: 665-673, 1993.

Weyer C, Chapman I, Parker B, Doran S, Feinie-Bisset C, Wishart J, Lush C, Chen K, Lacerte C, Wang Y, Burns C, et al. Pramlintide reduced ad-libitum food intake and meal duration independently of ghrelin, PYY, CKK, and GLP-1: Further evidence for a physiological role of amylin agonism in human appetite control. *Obesity Rev*, 6 (S1): Abs 0052, 2005.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (5): 1930-1935, 2001.

Whigham LD, Dhurandhar NV, Rahko PS, Atkinson RL. Comparison of combinations of drugs for treatment of obesity: body weight and echocardiographic status. *Int J Obes*, advance online publication, 2006.

Whigham LD, Israel BA, Atkinson RL. Adipogenic potential of multiple human adenoviruses in vivo and in vitro in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290: 190-194, 2006.

Whitcomb DC, Puccio AM, Vigna SR, Taylor IL, Hoffman GE. Distribution of pancreatic polypeptide receptors in the rat brain. *Brain Res*, 760: 137-149, 1997.

Wilding J. AOD-9604 metabolic. *Curr Opin Investig Drugs*, 5: 436-40, 2004.

Wilding JP, Gilbey SG, Bailey CJ, Batt RA, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Increased neuropeptide Y mRNA and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the ob/ob mouse. *Endocrinology*, 132: 1939-1944, 1993.

Wilding J, Van Gaal L, Rissanen A, et al. A randomized double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of topiramate in the treatment of obese subjects: the OBES-002 Study Group. *Int J Obes*, 28:1399-410, 2004.

Williams G, Gill JS, Lee YC, Cardoso HM, Okpere BE, Bloom SR. Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 38: 321-327, 1989.

Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology*, 144: 5184-5187, 2003.

Williams G, Joanne A, Harrold, Cutler DJ. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: Lifting the lid on the black box. *Proc Nutr Soc*, 59: 385-396, 2000.

Williams KV, Kelley DE. Metabolic consequences of weight loss on glucose metabolism and insulin action in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 2: 121-9, 2000.

Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Ann Rev Neurosci*, 24: 429-458, 2001.

Wilson BD, Ollmann MM, Barsh GS. The role of agouti-related protein (AGRP) in regulation of body weight. *Mol Med Today*, 5: 250-256, 1999.

Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum*, 48 (2): 418-429, 2003.

World Health Organization. <http://www.who.int>.

Wolfe BM, Morton JM. Weighing in on bariatric surgery: procedure use, readmission rates, and mortality. *JAMA*, 294: 1960-1963, 2005.

Woods SC, Decke E, Vasselli JR. Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev*, 81: 26-43, 1974.

Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition*, 16: 894-902, 2000.

Woods SC, Seeley RJ. Insulin as an adiposity signal. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 (Suppl 5): 35-38, 2001.

Wortley KE. Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest*, 115: 3573-3578, 2005.

Wynne K. Subcutaneous oxyntomodulin reduces body weight in overweight and obese subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes*, 54: 2390-2395, 2005.

Wynne K. Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: a randomised controlled trial. *Int J Obes*, 30: 1729-1736, 2006.

Xu H, Barnes GT, Yang Q. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112: 1821-1830, 2003.

Yahata T, Habara Y, Kuroshima A. Effects of glucagon and noradrenalina on the blood flow through brown adipose tissue in temperature-acclimated rats. *Japan J Physiol*, 33: 367-376, 1983.

- Yamauchi T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med*, 7: 941-946, 2001.
- Yamauchi T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423: 762-769, 2003.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPAR-gamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem*, 276: 41245-41254, 2001.
- Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukuyama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T. Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 108: 1001-1013, 2001.
- Yang YK, Thompson DA; Dickinson CJ, Wilken J, Barsh GS, Kent SBH, Gantz I. Characterization of agouti-related protein binding to melanocortin receptors. *Mol Endocrinol*, 13: 148-155, 1999.
- Yanovski SZ, Yanovski JA. Drug therapy: Obesity. *N Engl J Med*, 346: 591-602, 2002.
- Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Phys Rev*, 81: 1097-1142, 2001.
- Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*, 351: 1106-1118, 2004.
- Yoon M, Jeong S, Nicol CJ, Lee H, Han M, Kim JJ, Seo YJ, Ryu C, Oh GT. Fenofibrate regulates obesity and lipid metabolism with sexual dimorphism. *Exp Mol Med*, 34: 481-488, 2002.
- Yuan CS, Attele AS, Wu JA, Zhang L, Shi ZQ. Peripheral gastric leptin modulates brain stem neuronal activity in neonates. *Am J Physiol*, 277: 626-630, 1999.
- Yubero P, Masanés RM, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Modulation of muscle UCP expression by oleoyl-estrone in the rat. *J Physiol Biochem*, 57 (3): 289-290, 2001.
- Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG. PTP-1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell*, 2: 489-495, 2002.
- Zakrewska KE, Cusin I, Sainsbury A, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin. Toward and understanding of leptin resistance. *Diabetes*, 46: 717-719, 1997.
- Zarrindast MR, Abolfathi-Araghi F. Effects of bupropion on core body temperature of mice. *Psychopharmacology*, 106: 248-252, 1992.

Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and interleukin-1 beta release in human subcutaneous adipocytes and preadipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(6): 2817-2825, 2001.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature* 372:425-431, 1994.

Zhang Y, Scarpace PJ. The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol Behav*, 88 (3): 249-256, 2006.

Zhenjun T, Ronald F, Jiang C, Zhang X. Galanin inhibits gut-related vagal neurons in rats. *J Neurophysiol*, 91: 2330-2343, 2004.

Zhou A, Bloomquist BT, Mains RE. The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing. *J Biol Chem*, 268: 1763-1769, 1993.

Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, Jones AE, Deysher AE, Waxman AR, White RD, et al. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 115: 3564-3572, 2005.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Hang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7 (2): 211-228, 2001.

Zychlinski L, Montgomery MR. Alterations in monoamine oxidase activity after single and repeated exposure of rats to chlorphentermine. *Toxicol Lett*, 22: 133-138, 1984.

