

# ÍNDIX

<b>ÍNDIX DE FIGURES .....</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDIX DE TAULES.....</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDIX D'ABREVIATURES. ....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. PATOGÈNIA DE LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 2.....</b>	<b>12</b>
1.1.1. SECRECIÓ D'INSULINA I RESISTÈNCIA A LA INSULINA A LA DM2.....	12
1.1.1.1. Secreció d'insulina a la DM2.....	12
1.1.1.2. Resistència a la insulina a la DM2.....	13
1.1.2. HIPÒTESI SOBRE EL FENOTIP I EL GENOTIP ESTALVIADOR (THRIFTY PHENOTYPE AND GENOTYPE) .....	15
<b>1.2. MECANISMES CEL·LULARS DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA .....</b>	<b>17</b>
1.2.1. ACCIÓ DE LA INSULINA A NIVELL CEL·LULAR .....	17
1.2.2. PROTEÏNES AMB ALTERACIONS GENÈTIQUES ASSOCIADES A RESISTÈNCIA A LA INSULINA .....	19
1.2.2.1. Receptor d'insulina .....	20
1.2.2.2. Substrats del receptor de la insulina (IRS).....	20
1.2.2.3. Subunitat de la PI3-K p85 $\alpha$ .....	20
1.2.2.4. Transportadors de glucosa.....	21
1.2.2.5. La glicogen sintasa.....	21
1.2.3. MECANISMES CEL·LULARS ASSOCIATS A RESISTÈNCIA A LA INSULINA .....	22
1.2.3.1. La hiperglucèmia.....	22
1.2.3.2. El PPAR $\gamma$ .....	22
1.2.3.3. Les adipoquines.....	23
<b>1.3. EL FACTOR DE NECROSI TUMORAL ALFA .....</b>	<b>28</b>
1.3.1. BIOSÍNTESI I ESTRUCTURA PROTEICA DEL TNF $\alpha$ .....	28
1.3.2. ESTRUCTURA DEL GEN DEL TNF $\alpha$ .....	30
1.3.3. RECEPTORS DE TNF $\alpha$ .....	30

1.3.4. ELS GENS DEL TNFR1 I TNFR2 .....	32
1.3.5. ACCIONS DEL TNF $\alpha$ SOBRE EL METABOLISME. ESTUDIS “IN VIVO” I “IN VITRO” SOBRE ANIMALS D’EXPERIMENTACIÓ .....	34
1.3.5.1. Accions del TNF $\alpha$ sobre el metabolisme lipídic.....	34
1.3.5.2. Accions del TNF $\alpha$ sobre el metabolisme de la glucosa i acció de la insulina .....	35
1.3.5.3. Estudis genètics amb models de rates “knock-out” .....	37
1.3.6. EL TNF $\alpha$ COM A MEDIADOR DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA ALS HUMANS .....	41
1.3.6.1. Expressió del TNF $\alpha$ en teixit adipós i muscular humà i resistència a la insulina.....	42
1.3.6.2. Variacions en el gen del TNF $\alpha$ humà i resistència a la insulina .....	43
1.3.6.3. Els receptors R1 i R2 del TNF $\alpha$ i resistència a la insulina .....	43
<b>1.4. LA INTERLEUCINA-6.....</b>	<b>45</b>
1.4.1. SÍNTESI I ESTRUCTURA PROTEICA.....	45
1.4.2. ESTRUCTURA DEL GEN DE LA IL-6.....	45
1.4.3. RECEPTOR DEL LA IL-6. ESTRUCTURA I TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL.....	46
1.4.3.1. Estructura del receptor de la IL-6 i del gp130.....	46
1.4.3.2. Mecanisme de transducció del senyal per mitjà de gp130 .....	47
1.4.4. ACCIONS DE LA IL-6 SOBRE EL METABOLISME. ESTUDIS “IN VIVO” I “IN VITRO” SOBRE ANIMALS D’EXPERIMENTACIÓ. ....	48
1.4.4.1. Paper de la IL-6 sobre el metabolisme en humans.....	48
1.4.4.2. Estudis genètics de la IL-6 en humans.....	49
<b>2. OBJECTIUS .....</b>	<b>50</b>
<b>3. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. SUBJECTES MOTIU D’ESTUDI.....</b>	<b>55</b>
3.1.1. ESTUDI 1. ....	55
3.1.2. ESTUDI 2. ....	56
3.1.3. ESTUDI 3.....	57
3.1.4. ESTUDI 4. ....	57
<b>3.2. RECOLLIDA DE DADES ENTRE TOTS ELS ESTUDIS.....</b>	<b>58</b>
<b>3.3. DESCRIPCIÓ DE LA METODOLOGIA .....</b>	<b>60</b>

3.3.1. PARÀMETRES CLÍNICS .....	60
3.3.1.1. Índex de Massa Corporal (BMI) .....	60
3.3.1.2. Grau d'Obesitat .....	60
3.3.1.3. Determinació de la Tensió Arterial .....	60
3.3.2. PARÀMETRES ANTROPOMÈTRICS. AVALUACIÓ DE LA COMPOSICIÓ CORPORAL .....	61
3.3.2.1. Mesures Antropomètriques .....	61
3.3.2.2. Impedància Bioelèctrica.....	64
3.3.3. PARÀMETRES METABÒLICS .....	64
3.3.3.1. Determinació de la Resistència a la Insulina.....	65
3.3.3.2. Determinació de Glucosa. ....	66
3.3.3.3. Determinació d'Insulina.....	66
3.3.3.4. Determinació del Colesterol Total. ....	67
3.3.3.5. Determinació de les Lipoproteïnes VLDLc, LDL-c i HDLc. ....	67
3.3.3.6. Determinació de Triglicèrids i VLDL – Triglicèrids. ....	68
3.3.3.7. Determinació d'Àcids Grassos Lliures. ....	68
3.3.3.8. Determinació de Nivells de HbA1c .....	68
3.3.3.9. Determinació de les Fraccions Solubles dels Receptors 1 i 2 del TNF $\alpha$ i dels Nivells de IL-6.....	68
3.3.3.10. Determinació de Leptina.....	69
3.3.3.11. Determinació de Globulina Transportadora de Cortisol (CBG) i la Globulina Glicosidada.....	70
3.3.3.12. Fórmula Leucocitària i Recompte de Cèl.lules Blanques. ....	70
3.3.4. PARÀMETRES GENÈTICS.....	70
3.3.4.1. Extracció de l'Àcid Desoxirribonucèid (DNA) .....	70
3.3.4.2. Anàlisi de la Regió 3' no Traduïda del Gen del TNFR2.....	71
3.3.4.3. Anàlisi del Polimorfisme Genètic –174 del Gen de la IL-6.....	75
<b>3.4. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES. ....</b>	<b>78</b>
<b>4. PUBLICACIONS .....</b>	<b>80</b>
<b>5. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>109</b>
<b>5.1. ESTUDI 1.....</b>	<b>110</b>
<b>5.2. ESTUDI 2.....</b>	<b>114</b>

<b>5.3. ESTUDI 3.....</b>	<b>119</b>
<b>5.4. ESTUDI 4.....</b>	<b>123</b>
<b>6. CONCLUSIONS .....</b>	<b>126</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>129</b>

## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1.</b> Esquema de la transmissió dels senyals del receptor de la insulina.....	18
<b>Figura 2.</b> Esquema de l'estructura de l'homotrímer del TNF $\alpha$ .....	29
<b>Figura 3.</b> Esquema de l'estructura del gen del TNF $\alpha$ .....	30
<b>Figura 4.</b> Esquema de la família dels receptors de TNF.....	31
<b>Figura 5.</b> Esquema de l'estructura del gen-proteïna del TNFR2.....	33
<b>Figura 6.</b> Esquema de l'estructura del gen de la IL-6.....	46
<b>Figura 7.</b> Esquema de l'estructura del receptor de la IL-6 i el gp130.....	47
<b>Figura 8.</b> Esquema de la transmissió dels senyals de la IL-6.....	48
<b>Figura 9.</b> Fotografia del patró de bandes corresponent a les variants A1, A2 i A3.....	74
<b>Figura 10.</b> Fotografia del polimorfisme – 174G>C del gen de la IL-6.....	77

## **ÍNDIX DE TAULES**

<b>Taula 1.</b> Transportadors cel·lulars de glucosa.....	19
<b>Taula 2.</b> Mecanismes d'acció del TNF $\alpha$ sobre el metabolisme lipídic i de la glucosa..	37
<b>Taula 3.</b> Estudis “Knock-out” per al gen del TNF $\alpha$ i per als seus receptors.....	40
<b>Taula 4.</b> Variants genètiques de la regió 3'UTR del gen del TNFR2.....	75

## ÍNDEX D'ABREVIATURES

**Acrp30:** Adipocyte Complement Related Protein of 30kDa

**AGL:** Àcids grassos lliures

**Akt:** Proteïna Ser/Thr quinasa B

**AMP:** Adenosine Monophosphate

**AP1/AP2:** Activador de proteïna d'unió un /dos

**ATP:** Adenosine Triphosphate

**A<sub>260</sub> :** Absorbància a dos-cents seixanta nanòmetres

**Bis, bisacrilamida:** N,N' - metile- bisacrilamida

**BMI:** Body Mass Index

**bp:** base pair

**CBG:** Cortisol Binding Globulin

**C/EBP<sup>β</sup>:** CCAAT/ Enhancer Binding Proteins beta

**db:** Gen del receptor de la leptina

**DM:** Diabetes mellitus

**DM2:** Diabetes mellitus tipus dos

**dNTPs:** Deoxynucleoside (5' -) Triphosphate

**DNA:** Deoxyribonucleic Acid

**EASIA:** Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay

**fa/fa:** presència d'obesitat i diabetes

**FSIVGTT:** Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test

**GAS:** g- interferon Activacion Sites

**GLUT-1/-4:** Glucose Transporter-1/-4

**Gp130:** glycoprotein 130

**GSK-3:** glicogen sintetasa quinasa tres

**HbA1c:** Hemoglobin A1c

**HLA:** Human Leukocyte-associated Antigen

**IFN-γ:** Interferon-gamma

**Ig:** Immunoglobulin

**IL-6:** Interleucina sis

**IL-1:** Interleucina un  
**IRF-1:** Interferon Regulatory Factor 1  
**IRMA:** Immunoradiometric Assay  
**IRS:** Insulin Receptor Substrate  
**JAK-kinase:** Janus Kinase  
**Kb:** Kilobases  
**kDa:** Kilodaltons  
**LPL:** Lipoprotein Lipase  
**LPS:** Lipopolysaccharide  
**LT- $\alpha$ :** Lymphotoxin alpha  
**LT- $\beta$ :** Lymphotoxin beta  
**M:** Molar  
**MAP:** Mitogen-Activated Protein  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**mRNA:** Messenger Ribonucleic Acid  
**NF-AT:** Nuclear Factor of Activated T cells  
**NF-IL-6:** Nuclear Factor of IL-6  
**NF-kB:** Nuclear Factor- Kappa beta  
**ob:** Gen de la leptina  
**OGTT:** Oral Glucose Tolerance Test  
**P:** Fosfat  
**PAGE:** Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
**PCR:** Polimerase Chain Reaction  
**PI3-K:** Phosphatidylinositol 3 quinase  
**PKC:** Protein Quinase C  
**PPAR $\gamma$ :** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma  
**RAF:** Ser/Thr proteina quinasa  
**RFLP:** Restriction Fragment Lenght Polymorphism  
**RI:** Resistència a la Insulina  
**RIA:** Radioimmunoassay  
**Ser:** Serina.



**S<sub>G</sub>**: Eficàcia de la glucosa

**SHC**: Src Homology Collagen Protein

**S<sub>I</sub>**: Índex de sensibilitat a la insulina

**SNS**: Sympathetic Nervous System

**SP-1**: Specificity Protein 1

**SSCP**: Single Strand Conformation Polymorphisms

**STAT3**: Signal Transducers and Activators of Transcription 3

**sTNFRs**: Fraccions solubles dels receptors del factor de necrosi tumoral

**sTNFR1/sTNFR2**: Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor 1/2

**TACE**: TNF- $\alpha$  Converting Enzime

**Taq**: Thermus aquaticus

**TBE**: Tris/Borate Electroforesis

**TEMED**: N,N,N',N' - tetrametilendiamina

**Thr**: Treonina.

**TNF- $\alpha$** : Tumor Necrosis Factor alfa

**TNF- $\beta$** : Tumor Necrosis Factor beta

**TNFR1/TNFR2**: Tumor Necrosis Factor Receptor 1/2

**TRAF**: TNF Receptor-Associated Factor 2

**Tyr**: Tirosina.

**TZD**: Tiazolidinedione

**WHR**: Waist-Hip Ratio

**3'UTR**: Untranslated Region

# **1. INTRODUCCIÓ**

La diabetis mellitus (DM) és un grup de malalties metabòliques caracteritzades per hiperglucèmia deguda a defectes en la secreció d'insulina, l'acció de la insulina o ambdues. La majoria dels casos de diabetis pertanyen a dues categories etiopatogèniques. La DM tipus 1 és deguda a un dèficit d'insulina a causa d'una pèrdua de massa cel·lular  $\beta$  per un procés autoimmunològic sobre l'illot pancreàtic. L'altra categoria, la DM tipus 2, molt més prevalent, és fruit de la combinació d'una resistència a la insulina i d'una inadequada resposta compensatòria de secreció d'insulina pel pàncrees.

La diabetis mellitus tipus 2 (DM2) representa entre el 70 i el 85% del total de diabetis en la majoria dels països amb un 6% de prevalença en el món occidental. Apareix més freqüentment en adults (> 30 anys) i la incidència augmenta amb l'edat. És una de les malalties no declarades més importants per la seva altíssima prevalença i pels importants costos socials que representen les seves substancials morbiditat i mortalitat, freqüentment per complicacions associades, tant de tipus agut (coma hiperglucèmic i hiperosmolar, hipoglucèmies) com cròniques.

Les complicacions cròniques es presenten en forma de microangiopatia (sobretot als sistemes renal i ocular i als nervis perifèrics) i de macroangiopatia. Aquesta darrera es caracteritzada pel desenvolupament accelerat d'aterosclerosi sobretot a vasos coronaris d'extremitats inferiors i cerebrals. Els principals factors involucrats són la dislipèmia, la hiperinsulinèmia i la hiperglucèmia. Aquestes darreres complicacions són les més freqüents i les que s'associen a un increment d'incidència de malaltia coronària, malaltia vascular perifèrica i malaltia cerebrovascular. La lesió macrovascular és la que s'associa a major morbimortalitat total.

Típicament la DM2 roman lliure de símptomes durant un temps, fins i tot anys, amb una progressiva i subtil aparició de la simptomatologia. El diagnòstic moltes vegades esdevé principalment per una troballa accidental, per la presentació de polidípsia o poliúria, per infeccions recurrents o per complicacions pròpies de la DM2. Això fa que, en una gran proporció, aquests pacients restin per diagnosticar. D'altra banda, els darrers estudis mostren un clar increment de pacients amb DM2. És probable que la proporció de pacients no diagnosticats disminueixi en un futur, quan s'identifiquin processos patogènics i defectes genètics específics que permetin una millor comprensió de la malaltia i una detecció més precoç.

## 1.1. PATOGÈNIA DE LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 2

### 1.1.1. SECRECIÓ D'INSULINA I RESISTÈNCIA A LA INSULINA A LA DM2

#### 1.1.1.1. Secreció d'insulina a la DM2

Sobre la base d'una gran quantitat d'estudis, sembla clar que el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 2 es dona quan la resistència a l'acció de la insulina en els teixits no pot ser compensada per la secreció d'insulina per la cèl·lula  $\beta$  pancreàtica (*Ferrannini E, 1998*). Així, els individus amb només resistència a la insulina poden romandre tolerants a la glucosa o amb tolerància disminuïda durant anys sense arribar a desenvolupar DM2.

No obstant això, hi ha dades que demostren una disminució de la massa cel·lular  $\beta$  pancreàtica amb la consegüent disminució de la capacitat de secreció d'insulina en els pacients amb DM2. Aquesta disminució de massa cel·lular ha estat en part relacionada amb dipòsits de substància amiloide, concretament d'un pèptid secretat per la mateixa cèl·lula  $\beta$ , l'amilina (*Zawalich WS, 1995*). A part de la disminució de la massa cel·lular total, també s'han observat alteracions en el ritme de secreció de la insulina, així com increments en la proporció de proinsulina en relació amb la insulina (*O'Rahilly S, 1988*) i (*Kahn SE, 1995*).

Finalment, altres dades que confirmen la hipòtesi de l'existència d'un defecte secretor de la cèl·lula  $\beta$  pancreàtica per desenvolupar una diabetis davant una resistència a la insulina ens les aporten els clàssics treballs amb dexametasona, en què la resistència a la insulina induïda per aquest fàrmac és compensada en individus sans, però no en pacients amb DM2 (*LaCava EC, 1985*).

La manca d'adaptació de la cèl·lula beta pot contribuir a la hiperglucèmia i s'observa freqüentment amb l'augment de l'edat, la inactivitat física i amb l'excés de pes. S'ha suggerit també l'existència d'una predisposició genètica ja existent en els individus prediabètics.

### **1.1.1.2. Resistència a la insulina a la DM2.**

La resistència a la insulina (RI) es defineix com la inhibició de l'acció de la insulina sobre el transport de glucosa des de l'espai extracel·lular (sang o fluid intersticial) a les cèl·lules dels teixits insulino sensibles, principalment el fetge, el múscle esquelètic i el teixit adipós.

El factor fonamental que s'observa en les fases inicials de la DM2 és una hiperglucèmia postprandrial que depèn bàsicament de la resistència muscular a l'acció de la insulina. Més tard els pacients desenvolupen una progressiva hiperglucèmia en dejú, la qual podria ser, en part, explicada per un augment de producció glucosa hepàtica deguda a la resistència a la insulina en el fetge.

Les causes de resistència a la insulina poden classificar-se en hereditàries o adquirides.

#### a) Causes hereditàries per al desenvolupament de la RI .

S'han descrit diverses mutacions en gens relacionades amb l'acció de la insulina. Aquestes variacions genètiques puntuals expliquen només una fracció petita (un 5%) de totes les possibles causes de resistència a la insulina, i, per tant, probablement resten per identificar la majoria dels gens implicats en la predisposició d'aquest desordre.

No hi ha dubte, però, que en el desenvolupament de la DM2 existeix una forta predisposició genètica. D'una banda, diversos estudis demostren una incidència de la malaltia variable entre els grups ètnics de poblacions humanes. D'altra banda una evidència clara de la importància del factor genètic prové dels estudis amb bessons homozigots, que mostren una concordança per la DM2 del 90% (*Barnett A, 1981*). Ara bé, el tipus d'herència continua sense ser coneguda.

El fet que la DM2 és típicament una malaltia d'edat avançada fa pensar que a part del factor genètic que predisposa a la RI, és possible que intervinguin factors ambientals o adquirits per al desenvolupament final del fenotip. Tot seguit descriurem breument alguns d'aquests factors.

b) Causes adquirides per al desenvolupament de la DM2.

Les condicions adquirides més associades a resistència a la insulina o més comunament associades a desenvolupament de DM2 són l'edat, la gestació, la inactivitat física i l'obesitat.

L'edat: és àmpliament conegut que la RI augmenta amb l'edat (*DeFronzo RA, 1979*), segurament per diferents causes, però la més evident és per la seva associació amb canvis en la composició corporal. L'edat comporta una pèrdua de massa muscular i un augment de massa grassa (*Borkan GA, 1983*), aquesta darrera associada a RI.

La gestació: durant el tercer trimestre de gestació, es desenvolupa una resistència a la insulina. Moltes gestants, però, romanen tolerants a la glucosa per compensació amb una sobresecreció d'insulina. Altres, que no poden compensar aquesta RI acaben desenvolupant una diabetis gestacional que després del part pot manifestar-se com una veritable DM2 (*Kjos SL, 1995*). Les raons del desenvolupament de la diabetis gestacional no són del tot conegudes.

L'activitat física: l'augment de l'activitat física va acompanyada generalment de millores en la sensibilitat perifèrica a la insulina per un mecanisme no del tot comprès. Alguns autors atribueixen aquest fet a un augment del transportador de glucosa-4 en el múscul esquelètic (*Houmard JA, 1991*).

L'obesitat: la DM2 s'associa fortament amb l'obesitat. Aproximadament un 80% dels pacients amb DM2 són obesos. El fet que la RI augmenti amb el guany de pes i disminueixi amb la pèrdua de pes (*Sims EAH, 1973*) fa pensar que l'acumulació de massa grassa pot ser una causa de RI. De fet, molts investigadors suggereixen que la RI en la majoria dels pacients amb DM2 és el resultat d'un increment de l'adipositat visceral (obesitat central) (*Lemieux S, 1996*). Aquesta

adipositat, a diferència de la subcutània o de l'obesitat total, es correlaciona de forma independent amb la RI (*Kissebah AH 1994*).

En els darrers anys, a redós d'importants estudis en fisiopatologia de l'obesitat, s'ha descobert el paper actiu del teixit adipós quant a la secreció de substàncies que prenen part activa en l'homeòstasi de la glucosa. Entre aquestes substàncies destaquen: els àcids grassos lliures, la leptina, l'adiponectina, la resistina i les citocines, com el factor de necrosi tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) i la interleucina 6 (IL-6). Aquestes molècules han demostrat un paper regulador de l'acció de la insulina en els teixits diana i sobre la secreció d'insulina en el pàncrees. S'ha suposat que una expansió del teixit adipós, especialment de la regió abdominal, pot donar lloc a un augment d'alliberació d'aquests productes, que mitjançant una acció endocrina induïren a RI en altres teixits (múscul esquelètic i fetge) i, fins i tot, alteracions de la secreció de la cèl·lula pancreàtica (*Hotamisligil GS, 1994 i Boden G, 1997*).

### **1.1.2. HIPÒTESI SOBRE EL FENOTIP I EL GENOTIP ESTALVIADOR (THRIFTY PHENOTYPE AND GENOTYPE)**

El concepte del genotip estalviador ajuda a aportar una explicació sobre el desenvolupament de la DM2 i la prevalença actual des d'un punt de vista evolutiu. El primer en definir aquest concepte va ser Neel (*Neel JV, 1962*). L'autor proposa que en èpoques de fam, períodes als quals l'home primitiu estava sovint exposat, el "genotip diabètic" (format per combinació de gens diferents) permetria de forma més eficient la utilització dels recursos nutritius per l'organisme, i facilitaria l'emmagatzematge de calories en forma de greix.

Els gens estalviadors que formen aquest genotip, haurien tingut un efecte selectiu en l'evolució, ja que els individus que el tinguessin, en períodes de manca, presentarien un índex de supervivència més elevat i haurien tendit a augmentar el seu nombre de descendents respecte d'aquells que no el tinguessin. Avui en dia, en canvi, amb una contínua abundància de calories, aquests gens tendrien a predisposar a l'obesitat i la diabetis. La forta associació entre aquestes dues patologies dóna suport a aquesta hipòtesi.

Els estudis a favor del genotip estalviador es donen en rosegadors, en els quals es demostra que els animals amb diabetis i obesitat presenten una capacitat per sobreviure a la manca d'aliments millor que els controls sans (*Coleman DL, 1979*).

D'altra banda, estudis recents han demostrat una relació entre certs marcadors d'activitat inflamatòria com el TNF-alfa, la IL-6, la proteïna C reactiva i la RI (*Pickup JC, 1997*). S'ha suposat que aquesta relació té el seu origen en una adaptació filogenètica dels nostres avantpassats davant les agressions a les quals sovint estaven exposats. En aquestes condicions, l'activitat inflamatòria preponderant devia suposar una clara adaptació, al contrari que en l'actualitat (*Fernandez-Real JM, 1999*).



## 1.2. MECANISMES CEL·LULARS DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA

Els mecanismes que es descriuràn intenten explicar a nivell molecular els estats de resistència a la insulina, especialment a l'obesitat i a la diabetis tipus 2. Durant dècades, la investigació sobre la resistència a la insulina s'ha centrat en identificar en els teixits diana les molècules que intervenen en la transducció del senyal d'aquesta hormona. Abans de descriure les molècules que s'hi han vist implicades, per situar-les a nivell cel·lular repassarem molt breument la transducció del senyal de la insulina i algunes de les proteïnes que hi intervenen.

### 1.2.1. ACCIÓ DE LA INSULINA A NIVELL CEL·LULAR

La insulina és una hormona amb potents efectes essencials per a l'homeòstasi normal de la glucosa i per al metabolisme lipídic i de proteïnes. Actua com a hormona anticatabòlica, ja que inhibeix la gluconeogènesi, la glucogenòlisi, la lipòlisi i la proteòlisi, i com a hormona anabòlica, ja que activa sistemes de transport i enzims relacionats amb la utilització i l'emmagatzematge d'aminoàcids, àcids grassos i glucosa. Els teixits més importants per la seva acció són el fetge, el múscul i el teixit adipós.

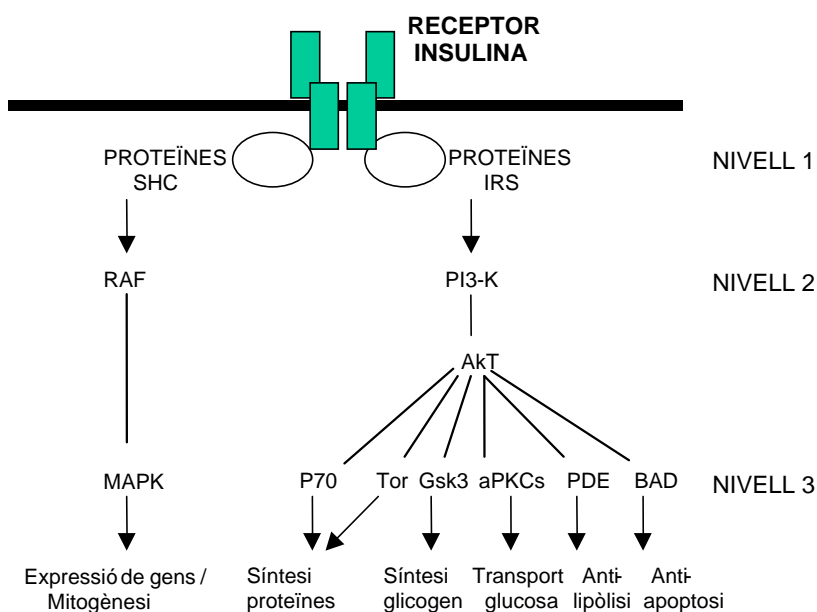
La insulina inicia l'acció en unir-se al seu receptor de membrana, expressat tant en els teixits diana clàssics per la insulina com en els no clàssics (cèl·lules de la sang, intestí, cervell, cèl·lules gonadals, etc.). El receptor és una proteïna transmembrana tirosina (Tyr)-quinasa, amb dues subunitats  $\alpha$  i dues  $\beta$  que formen una estructura heterotetràmera  $\alpha_2 \beta_2$  (Ullrich A, 1985), (Ebina Y, 1985). La unió de la insulina a zones específiques de la subunitat  $\alpha$  permet un ràpid canvi de conformació en el receptor que posa en marxa l'activitat tirosina-quinasa de la subunitat  $\beta$ . Aquesta activitat es tradueix en una autofosforilació del receptor de tres residus Tyr. Finalment, l'autofosforilació del receptor provoca un canvi de conformació que permet a molècules d'adenosin trifosfat (ATP) arribar al lloc catalític i als substrats que puguin ser fosforilats en residus Tyr (Hubbard SR, 1994 i Hubbard SR, 1997).

El receptor també és regulat negativament per una fosforilació en residus Serina/Treonina (Ser/Thr) per mitjà de quinases i de la pròpia insulina.

Els senyals del receptor es tradueixen per cascades de proteïnes fosforilades mitjançant dues vies principals: una, mitjançant la proteïna quinasa “mitogen activated protein quinasa” (MAP) que intervé en els efectes de creixement de la insulina, i l'altra, per la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) per on es duen a terme els efectes sobre el metabolisme.

Les proteïnes que hi intervenen poden ser agrupades en tres nivells. En el primer nivell hi intervenen molècules que s'uneixen directament al receptor, com els substrats de receptor d'insulina (IRS-1, 2, 3 i 4), i la Src i proteïna homòloga al col·lagen (SHC). El segon nivell el representen intermediaris com les proteïnes RAF, la PI3-K i la proteïna Ser/Thr quinasa B (Akt). Les molècules que formen aquests dos nivells anteriors actuen sobre la membrana plasmàtica o en el citosol cel·lular. El tercer nivell el formen proteïnes quinases com la MAP quinasa (MAPK), la proteïna quinasa C (PKC), i el glicogen sintetasa 3 (GSK-3), que son translocades al nucli. Allí actuen com a reguladores de la transcripció de determinats gens (*Albert KGMM, 1997*) (figura 1).

**Figura 1.** Esquema de la transmissió dels senyals del receptor de la insulina



La glucosa és transportada a l'interior de la cèl·lula mitjançant cinc transportadors de membrana amb propietats cinètiques i distribucions cel·lulars diferents (*Shepherd PR, 1999*). L'únic transportador que depèn d'insulina és el Glut-4, expressat en múscul i teixit adipós (taula 1).

**Taula 1.** Transportadors cel·lulars de glucosa

<b>TRANSPORTADORS DE GLUCOSA</b>		
<b>Transportador</b>	<b>Localització</b>	<b>Classificació</b>
GLUT-1	Cèl·lules vermelles, cervell	Glucosa dependent
GLUT-2	Fetge, cèl·lules B	Glucosa dependent
GLUT-3	Neurones	Sodi dependent
GLUT-4	Múscul, teixit adipós	Insulina depenent
GLUT-5	Intestí prim, cervell, múscul	Transportador fructosa, afinitat baixa per glucosa

Tot seguit citarem diverses molècules amb alteracions genètiques que s'han associat a resistència a la insulina i descriurem alguns mecanismes moleculars que s'han relacionat com a possibles mediadors d'aquest desordre.

### **1.2.2. PROTEÏNES AMB ALTERACIONS GENÈTIQUES ASSOCIADES A RESISTÈNCIA A LA INSULINA**

En algunes d'aquestes molècules s'han descrit mutacions en el gen corresponent que afecten tant la funció de la proteïna com l'expressió del gen. En altres casos només s'han descrit una expressió o funció anòmala de la proteïna sense identificar-se el defecte genètic. Finalment, en algunes molècules s'han descrit associacions entre algun polimorfisme genètic i la RI. En cap cas, però, s'ha demostrat que aquestes anomalies descrites juguin per si soles un paper dominant per al desenvolupament de la RI en la DM2 i en l'obesitat (*Krook A, 1996*), (*Freidenberg GR, 1988*).

### **1.2.2.1. Receptor d'insulina**

Mutacions: (*Kadowaki T, 1988*) s'han descrit més de cent mutacions capaces d'afectar de formes diverses el receptor, entre les quals destaquem:

- 1- Disminució en la síntesi d'una de les seves subunitats.
- 2 - Alteracions en el transport del receptor a la membrana.
- 3 - Alteracions en l'acoblament de la insulina al receptor.
- 4 - Degradació accelerada del receptor.
- 5 - Disminució de l'activitat tirosina-quinasa.

Expressió genètica i funció proteica: Alguns autors han observat que tant els nivells d'expressió del gen del receptor com la seva activitat tirosina-quinasa es troben disminuïts en el teixit adipós i en el múscul esquelètic d'individus amb obesitat, i també en aquest darrer teixit i en el fetge d'individus amb DM2 (*Caro JF, 1987*). La pèrdua de pes dels individus obesos millora l'expressió del gen junt amb la recuperació de la sensibilitat a la insulina. En la DM2, però, la recuperació de la sensibilitat a la insulina no és completa, fet que suggereix l'existència d'un defecte postreceptor addicional (*Freidenberg GR, 1988*).

### **1.2.2.2. Substrats del receptor de la insulina (IRS)**

Expressió genètica: L'expressió del gen del substrat IRS-1 es troba reduïda en els adipòcits d'individus amb DM2 obesos (*Rondinone CM, 1997*)

Associacions genètiques: Al substrat IRS-1 s'han descrit cinc mutacions, només l'anomenada G972R s'ha descrit associada a resistència a la insulina tant en individus amb DM2 com en població sana (*Yoshimura R, 1997*).

### **1.2.2.3. Subunitat de la PI3-K p85 $\alpha$**

Associacions genètiques: En població general, s'ha descrit una associació genètica entre la mutació anomenada M326I i la resistència a la insulina. Els individus homozigots

per aquesta mutació presenten una reducció de sensibilitat a la insulina (*Hansen T, 1997*).

#### **1.2.2.4. Transportadors de glucosa**

Mutacions: Per la seva expressió en els teixits diana de la insulina i la seva regulació per insulina, el transportador Glut-4 ha estat el més estudiat. Les mutacions en el gen que codifica el Glut-4 en els individus amb DM2 són rares i presenten la mateixa prevalença que a la població general.

Expressió genètica i funció proteica: S'han trobat alteracions en el nombre i funció del transportador Glut-4 i també en la seva translocació. Així, els adipòcits de pacients amb DM2 o amb obesitat mostren un descens del transportador que es correlaciona amb un descens del seu mRNA. En canvi, en el múscul esquelètic les concentracions són normals, però presenten una menor capacitat de la insulina per translocar-los a la membrana (*Kahn BB, 1992*).

#### **1.2.2.5. La glicogen sintasa**

Expressió genètica i funció proteica: La síntesi de glucogen, producte d'aquest enzim, està marcadament reduïda en el múscul dels individus amb DM2.

Associacions genètiques: S'han descrit polimorfismes en el gen de la glicogen sintasa associats a diabetis amb alta agregació familiar a Finlàndia (*Kahn CR, 1994*), però els resultats no s'han reproduït en altres poblacions (*Kadowaki T, 1993*).

A part d'aquestes alteracions genètiques puntuals, s'han descrit possibles mecanismes moleculars mediadors de resistència a la insulina mitjançant diversos factors que sabem que formen part en el metabolisme de la glucosa i que s'han trobat alterats tant en l'obesitat com en la DM2. En el següent apartat descriurem els mecanismes moleculars d'aquests factors que han tingut més ressò o els que encara són avui en dia motiu d'estudi.

### 1.2.3. MECANISMES CEL·LULARS ASSOCIATS A RESISTÈNCIA A LA INSULINA

#### 1.2.3.1. La hiperglucèmia

La pròpia hiperglucèmia disminueix la sensibilitat a la insulina, així com la secreció d'aquesta hormona, un fenomen comunament conegut com a toxicitat de la glucosa (*Rossetti L, 1995*) o glucotoxicitat. Existeixen dues teories que intenten explicar com la hiperglucèmia indueix a la resistència a la insulina: pels productes hexosamina o per l'activació de la proteïna quinasa C (PKC). Pel que fa a la hexosamina, es coneix que entre el 2% i el 4% de la glucosa captada per un teixit és desviada de la via glucolítica a nivell de la fructosa 6-P cap a la via hexosamina per formar glucosamina-6-P i altres productes hexosamina (*McClain DA, 1996*). S'ha demostrat que l'exposició del múscul esquelètic a glucosamina redueix la translocació del transportador de glucosa GLUT-4 (*Baron AD, 1995*). Quant a la segona teoria de la PKC, sembla que la seva activació per nivells elevats de glucosa dóna lloc a la fosforilació del receptor d'insulina en serina i es produeix una inhibició de la seva activitat (*Kellerer M, 1995*).

#### 1.2.3.2. El PPAR $\gamma$

Relacionada amb el teixit adipós, una molècula darrerament estudiada és el receptor activat per proliferadors de peroxisomes gamma (PPAR $\gamma$ ). Pertany a una família de receptors nuclears involucrats en la regulació de gens que inclou, a més a més, el PPAR $\alpha$  i el PPAR $\delta$ . El PPAR $\gamma$  s'expressa poc en el múscul i en el fetge; en canvi, al teixit adipós l'expressió és elevada i funciona com a important regulador de l'adipogènesi (*Spiegelman BM, 1998*).

Els resultats d'estudis amb animals deficients del gen del PPAR $\gamma$  i de variacions en el gen en humans són consistents, amb un paper secundari d'aquesta molècula amb la sensibilitat a la insulina. No obstant això, no tots coincideixen. Així, mentre que s'han descrit mutacions que donen lloc a una proteïna deficient en funció que s'associa a

millora de sensibilitat a la insulina (*Ristow M, 1998*), també s'han descrit mutacions en el domini d'unió en individus amb resistència a la insulina severa (*Barroso I, 1999*).

En aquest mateix sentit és conegut que les tiazolidinediones (TZDs), els nous “sensibilitzadors d'insulina” utilitzats en pacients amb resistència a la insulina, són lligants d'alta afinitat pels PPAR $\gamma$ . Els efectes de les TZDs mitjançant el PPAR $\gamma$  en l'increment de la sensibilitat a la insulina en el fetge i el múscul podrien ser directes, ja que la millora de RI s'ha comprovat en absència de teixit adipós (*Burant CF, 1997*), o bé indirectes, mitjançant primers efectes sobre el teixit adipós transmesos als altres teixits via canvis en els nivells de mediadors secretats pel teixit adipós com àcids grassos, el factor de necrosi tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) o la leptina (*Spiegelman BM, 1998*).

### **1.2.3.3. Les adipoquines**

S'ha demostrat que el teixit adipós pot tenir funcions d'òrgan secretor i com a tal sintetitzar una varietat de proteïnes que s'han anomenat adipoquines. S'ha suposat que l'expansió d'aquest teixit als individus obesos dóna lloc a la secreció defectuosa d'adipoquines, que són alliberades al torrent sanguini i podrien oferir resistència a la insulina en altres teixits (múscul i fetge, sobretot) o bé podrien actuar de forma paracrina entre el mateix teixit o els més pròxims a ell. Breument detallarem les que s'hi han vist més implicades, que són els àcids grassos lliures, la leptina, l'adiponectina i la recentment descoberta resistina.

#### **a) Els àcids grassos lliures (AGL)**

Molts estudis evidencien el nexa entre els nivells plasmàtics d'AGL i la RI en els teixits diana de la insulina. Els nivells d'AGL es troben elevats a l'obesitat (*Reaven G, 1988*) i augments aguts d'aquests nivells incrementen la RI de forma dosi-dependent, tant en individus diabètics (*Boden G, 1995*) com no diabètics (*Boden G, 1991*). També és conegut que els adipòcits intraabdominals presenten menys receptors insulínics i més receptors adrenèrgics, cosa que els dóna més capacitat lipolítica adrenèrgica i, augmenta la disponibilitat d'AGL a la circulació

portal (*Shimomura I, 1993*). De fet, estudis amb obesos o amb DM demostren que nivells alts d'AGL aboleixen completament els efectes de la insulina, i que d'altra banda, la inhibició de la lipòlisi (amb la subsegüent disminució d'AGL) amb un antilipolític millora la sensibilitat a la insulina fins a un 50% respecte a la d'un individu control (*Santomauro A, 1999*).

La investigació de la localització cel·lular on els AGL regulen la inhibició de l'acció de la insulina indica defectes en l'àmbit del transport de la glucosa o de la fosforilació de la glucosa a glucosa-6-P (els mètodes utilitzats no permeten diferenciar entre aquestes dues possibilitats) i de la síntesi de glicogen (*Boden, 1995*) en el teixit muscular.

El mecanisme molecular no està tampoc del tot comprès. L'efecte d'inhibició de l'acció de la insulina pels AGL no sembla directa, ja que s'observa un temps de demora de 3-4 hores. Les darreres investigacions suggereixen que els triglicèrids intramiocel·lulars del teixit muscular (localitzats dins de les fibres musculars) són els causants directes de la RI al múscul. D'acord amb aquesta opció, alguns estudis han demostrat una relació entre el contingut de teixit adipós muscular i la RI (*Pan DA, 1997*) i un darrer estudi descriu una correlació lineal entre els nivells plasmàtics d'AGL, els nivells de triglicèrids intramiocel·lulars en el múscul i un augment de resistència a la insulina després de 3,5 hores (*Boden G, 2001*). El temps necessari perquè els AGL s'acumulin com a triglicèrids dins el múscul dona suport a la proposta d'una relació indirecta AGL-RI.

El paper dels AGL segurament és molt important a l'hora d'explicar la fisiopatologia de la DM2; en aquest sentit s'ha desenvolupat la teoria de la lipotoxicitat. A part de la RI en el múscul, un augment de l'alliberament dels AGL des del greix visceral al sistema portal suposa un increment de la neoglucogènesi, cosa que interfereix en l'acció de la insulina en el fetge. La RI perpetuaria el cercle viciós d'hiperestimulació de la cèl·lula beta, que s'aniria deteriorant cap a la tolerància disminuïda a la glucosa. El deteriorament de la cèl·lula pancreàtica, incapaç de compensar la RI, conduiria a una progressiva manifestació de la diabetis (*McGarry JD, 1992*).



b) La leptina

La leptina, producte del gen anomenat *ob*, és secretada principalment pels adipòcits, sobretot els que formen la grassa subcutània. La leptina actua a nivell del seu receptor hipotalàmic (*db*) i inhibeix la producció del neuropèptid Y, el més potent factor conegut estimulant de la gana. Els resultats són la disminució de la ingesta, i, mitjançant l'activació del sistema nerviós simpàtic (SNS), un augment del metabolisme basal i del gast energètic.

El receptor *db* s'expressa també en teixits perifèrics (fetge, cel·lules  $\beta$  pancreàtiques i múscul estriat), cosa que implica una funció directa de la leptina sobre aquests teixits.

Des d'un principi ha existit una relació clara entre els nivells de la leptina i la sensibilitat a la insulina, sobretot a nivell d'experimentació animal. Els rosegadors amb defectes en els gens *ob* o *db* presenten resistència a la insulina i diabetis. Els estudis demostren que l'administració de leptina, abans dels seus efectes sobre la ingesta i en el pes corporal, augmenta la captació de glucosa pels teixits i millora la sensibilitat a la insulina (*Kamohara S, 1997*). Existeix controvèrsia entre si aquests efectes sobre el metabolisme de la glucosa són de forma directa a través dels receptors *ob* en els teixits o mitjançant l'activació del sistema nerviós simpàtic (*Kamohara S, 1997*), (*Liu L, 1998*).

Indirectament, la leptina indueix l'increment en oxidació dels àcids grassos (*Muoio DM, 1997*), un dels mecanismes pels quals pot millorar la captació de glucosa. En l'àmbit de l'experimentació animal, s'ha descrit també que els nivells de transcripció del gen de la leptina poden ser inhibits mitjançant activadors del gen del PPAR $\gamma$ , com els TZDs (*De Vos P, 1996*).

En el humans, però, la relació leptina i resistència a la insulina no està clarament demostrada i més aviat l'associació real sembla estar entre la leptina i l'obesitat. En la majoria dels pacients obesos els nivells de leptina circulant són elevats, i augmenten de forma exponencial amb l'augment de massa grassa corporal (*Considine RV, 1996*). Tot i que s'han descrit casos d'obesitat severa per absència de leptina, els defectes congènits en nivells i funció de la leptina són rars. Al

contrari, l'obesitat humana sembla un estat de resistència a la leptina, probablement per defectes en l'àmbit del receptor o post-receptor de la leptina (*Wurtman RJ, 1996*).

c) L'adiponectina

L'Acrp30 (Adipocyte Complement Related Protein), també coneguda com AdipoQ, apM1 o adiponectina, és una proteïna expressada exclusivament pels adipòcits diferenciats. Els pacients obesos, amb DM2 o amb malaltia arterial coronària mostren nivells plasmàtics d'adiponectina inferiors a la població control. (*Arita Y, 1999*), (*Hotta K, 2000*) i (*Noriyuki O, 1999*). Els nivells plasmàtics d'aquesta molècula es relacionen inversament amb els nivells d'insulina plasmàtica i la resistència a la insulina (*Weyer C, 2001*). En un estudi longitudinal amb pacients obesos que han reduït el pes per mitjà d'un "bypass" intestinal, els nivells d'aquesta molècula augmenten amb la reducció del pes i es correlacionen inversament amb la disminució de l'índex de massa corporal (BMI, "body mass index") la disminució dels nivells de glucosa i la millora de la resistència a la insulina.

L'expressió del gen de l'adiponectina s'ha demostrat que és reduïda tant en el teixit adipós d'individus obesos com en el de ratolins (*Hu E, 1996*). El gen ha estat mapat en una regió 3q27, considerada de susceptibilitat genètica per al desenvolupament de la diabetis (*Vionnet N, 2000*). S'han descrit algunes mutacions en els exons 2 i 3 del gen i els estudis d'associació s'han dut a terme sobre tot en poblacions japoneses. Una de les mutacions, la I164T, s'ha observat significativament més elevada entre una població amb DM2 i associada a nivells plasmàtics inferiors d'adiponectina (*Hidehiko K, 2002*).

d) La resistina

Molt recentment, Steppan C i altres, han descobert una nova molècula, que han anomenat resistina, secretada específicament pel teixit adipós (*Steppan C, 2001*).

En el seu treball amb rates genèticament obeses o induïdes amb dieta, els nivells de resistina augmenten amb la resistència a la insulina i s'hi correlacionen fortament. L'administració d'un anticòs antiresistina millora la glucosa circulant, així com la sensibilitat a la insulina d'aquests animals. Per aquests motius s'ha proposat que la resistina podria jugar un paper en la patogènesi de la resistència en la insulina i el gen que la codifica representa, per tant, un candidat potencial per a l'estudi de l'etiologia de la resistència a la insulina en la DM2 o en l'obesitat. En humans, però, els resultats no han estat tan rellevats. Els estudis "in vitro" demostren que l'expressió del gen en teixit adipós i muscular de pacients DM2 és quasi indetectable i semblant a l'expressió dels individus normals. Tampoc troben cap relació amb la resistència a la insulina ni amb cap paràmetre metabòlic (*Nagaev I, 2001*), (*Janke J, 2002*). Dos estudis d'associació entre polimorfismes en el gen de la resistina i poblacions amb DM2, una japonesa (*Haruhiko O, 2002*) i una altra italiana (*Sentinelli F, 2002*), demostren absència de relació entre els defectes genètics en el gen de la resistina i marcadors d'obesitat i de resistència a la insulina.

A més a més d'aquestes molècules que hem descrit, el teixit adipós és capaç de sintetitzar citocines. Les citocines sintetitzades per la cèl·lula adipocitària semblen intervenir directament o indirectament en el procés de mediació de la RI. En aquest sentit les citocines més destacades són el factor de necrosi tumoral alfa i la interleucina 6, que tot seguit passarem a comentar.

### 1.3. EL FACTOR DE NECROSI TUMORAL ALFA

El factor de necrosi tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) va ser originalment aïllat en el sèrum d'animals infectats inicialment amb *Mycobacterium bovis* i posteriorment tractats amb una endotoxina. Va ser descrit com una proteïna capaç de provocar necrosi hemorràgica de tumors sòlids i en alguns casos completa regressió de tumors trasplantats en ratolins (*Carswell E, 1975*). De forma independent, el TNF $\alpha$  va ser identificat com a factor responsable del desgast (caquèxia) observat durant les infeccions cròniques i secretat per macròfags (*Beutler B, 1987*).

A partir del seu descobriment, el TNF $\alpha$  s'ha aïllat en diversos tipus cel·lulars i teixits i s'ha relacionat amb un ampli espectre de respostes cel·lulars. Així, és considerat com una citocina moduladora de la resposta immunitària, inductora d'altres citocines, proliferadora cel·lular, diferenciadora i apoptòtica.

#### 1.3.1. BIOSÍNTESI I ESTRUCTURA PROTEICA DEL TNF $\alpha$

El TNF $\alpha$  defineix una família de citocines globalment coneguda com a factors de necrosi tumoral que inclou dues altres proteïnes estructuralment i funcionalment semblants: la linfotoxina- $\alpha$  (TNF- $\beta$  o LT- $\alpha$ ) i la linfotoxina- $\beta$  (LT- $\beta$ ). La principal font de TNF $\alpha$  és el fagòcit mononuclear activat pel lipopolisacàrid (LPS o endotoxina), component actiu de la paret de les bacteries gramnegatives, però també els limfòcits T i B, les cèl·lules activades de NK, els mastòcits (cèl·lules del sistema immune), el fibroblast, els osteoblasts, les cèl·lules epitelials de la retina i nombroses línies tumorals en secreten quantitats significants (*Aggarwal B, 1996*). El TNF $\alpha$  s'expressa també en cèl·lules del teixit epitelial, com a resposta a la invasió bacteriana, en l'adipòcit i en les cèl·lules del múscul esquelètic i cardíac (*Saghizadeh M, 1996*). La producció de TNF $\alpha$  és regulada per nombrosos estímuls. A part de l'endotoxina, també bacteries gram positives, virus (DNA i RNA), llevats, fongs, mitogens, diverses citocines i nombrosos fàrmacs activen la seva síntesi. Igualment, estímuls fisiològics com la febre i l'estrès, o les radiacions ionitzants indueixen la seva síntesi en macròfags (*Hallahan D, 1989*). La modulació negativa de la

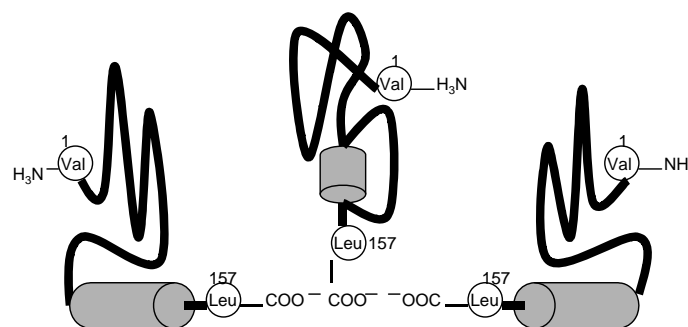
citocina és induïda per algunes citocines, esteroides, inhibidors de proteases, fosfodiesterases i de la síntesi de prostaglandines (*Nguyen D, 1990*).

El TNF $\alpha$  és sintetitzada com una proteïna no glucosada de 26 kDa i és característica la seva posició a la membrana. Aquesta forma de proteïna transmembrana és biològicament activa i sembla que té el seu paper en les respostes normals del TNF en els teixits o en certs estadis inflamatoris mitjançant un contacte directe cèl·lula a cèl·lula entre la citocina i els seus receptors (*Grell M, 1996*). Un efecte posterior proteolític (*Klieger M, 1988*) regulat per una activitat serinproteasa de l'enzim conversor del TNF $\alpha$  (TACE) allibera un fragment de 17 kDa a la circulació, s'uneix a altres fragments homòlegs i forma un homotrímer estable de 51 kDa, (*Abbas AK, 1995*) (figura 2).

Aquesta conformació en forma de trímers permet una millor unió amb els receptors, cosa que afavoreix una acció biològica més eficaç. En funció de la concentració de la citocina, aquestes accions biològiques possiblement són diferents. A causa de l'elevada afinitat que els receptors d'aquesta citocina presenten per al seu lligant, a concentracions baixes (aproximadament  $10^{-9}$  M) actua com a regulador autocrí i paracrí sobre les pròpies cèl·lules que el sintetitzen. Quan la concentració és elevada, la citocina podria passar al torrent sanguini i actuar de forma endocrina sobre diferents òrgans diana (*Abbas AK, 1995*).

Els estudis cristal·logràfics han donat a conèixer l'estructura tridimensional del TNF $\alpha$  i han confirmat la formació de l'homotrímer. Cada subunitat està formada per una estructura antiparal·lela de tipus "sandwich" (*Jones E, 1989*). També són àmpliament conegudes les regions de la molècula essencials per a la unió als receptors i la seva activitat biològica (*Zhang X, 1992*).

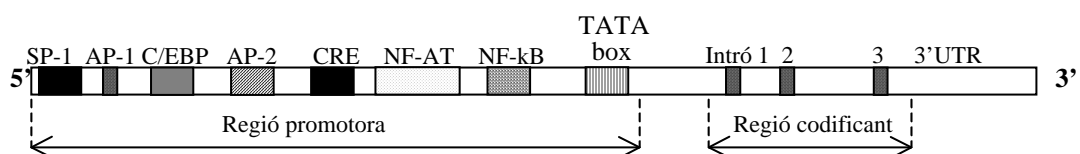
**Figura 2.** Esquema de l'estructura de l'homotrímer del TNF $\alpha$



### 1.3.2. ESTRUCTURA DEL GEN DEL TNF $\alpha$

El gen humà del TNF $\alpha$  va ser identificat per Nedwin (*Nedwin G, 1985*) al braç curt del cromosoma 6, a la regió 6p21.3. Es troba molt a prop del gen del TNF $\beta$ , a la regió del complex major d'histocompatibilitat. Té 3 Kilobases (Kb) de longitud i conté 4 exons i 3 introns. Tant el promotor com la zona 3' no traduïda (3'UTR) del gen contenen regions conservades en l'evolució que exerceixen un paper en la regulació de l'expressió de la citocina. El promotor conté llocs d'unió potencials per diversos factors de transcripció com: els activadors de proteïna d'unió un i dos (AP-1, AP-2), factor de transcripció Kappa beta (NF-kB), "nuclear factor of activated T cells" (NF-AT), específics de proteïna 1 (SP-1), potenciadors de proteïnes d'unió beta (C/EBP $\beta$ ) i elements de resposta a l'adenosin monofosfat (AMP) (figura 3). Aquests factors contribueixen a la complexa regulació del gen del TNF $\alpha$  i la seva interacció pot variar segons el tipus cel·lular i l'estímul extracel·lular específic (*Tsai EY, 1996*). El RNA missatger (mRNA) transcrit conté la seqüència de repetició ----UUAUUUAU---- de 33 nucleòtids de longitud, també present en altres citocines, factors de creixement i protooncògens (*Caput D, 1986*). Alguns estudis suggereixen que d'aquesta seqüència depèn la vida mitjana del mRNA (*Kontoyiannis D, 1999*).

**Figura 3.** Esquema de l'estructura del gen del TNF $\alpha$ .



### 1.3.3. RECEPTORS DE TNF $\alpha$

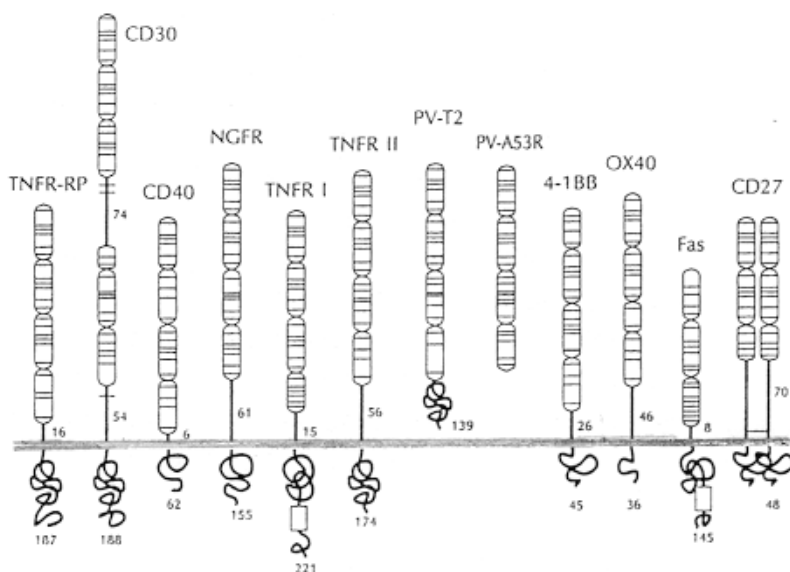
El TNF $\alpha$  està mancat d'activitat enzimàtica: totes les seves accions són el resultat de les respostes de la cèl·lula diana a la presència de la citocina. Fins ara, s'han descrit dos

receptors per mitjà dels quals la citocina regula les seves accions: el receptor de tipus 1 (TNFR1, CD120a, p55 o 55kDa) i el de tipus 2 (TNFR2, CD120b, p75 o 75kDa).

Els receptors són fundadors de la superfamília de receptors de TNF, la qual inclou dotze membres, tots ells receptors de membrana a excepció dels anomenats PV- T2 i PV- A53R (figura 4) (Smith C, 1990). Presenten l'estructura típica de proteïnes transmembrana, caracteritzada per una regió extracel·lular, una transmembrana i una citoplasmàtica. La primera, amb un motiu ric en cisteïnes repetit quatre cops, manté una alta homologia entre ambdós receptors i és la que defineix la superfamília (Dembic Z, 1990). En canvi, existeixen diferències importants quant a l'afinitat per al lligant i és superior per al receptor de tipus 2. Aquesta regió presenta també certa afinitat per a factors de creixement i altres citocines, cosa que confereix als receptors de TNF un elevat pleotropisme.

La regió intracel·lular, en canvi, presenta només un 30% d'homologia entre els receptors. El receptor TNFR1 (i el receptor anomenat Fas) conté un motiu denominat "Death Domain (DD)" el qual s'uneix a proteïnes que també tenen aquest domini. El TNFR2 (com la resta dels receptors), presenta un motiu menys definit que s'uneix a una família de proteïnes associades al receptor (TRAF).

**Figura 4.** Esquema de la superfamília de receptors de TNF



Els receptors s'expressen ubiquament encara que en quocients diferents segons el tipus cel·lular (*Smith C, 1994*). Les funcions biològiques del TNFR1 i el TNFR2 no es coneixen amb exactitud. Sembla que el TNFR1 regula els senyals de TNF més coneguts incloent l'apoptosi, la citotoxicitat, la diferenciació i la proliferació, i que l'R2 transdueix les accions metabòliques (*Hotamisligil GS, 1997*). Alguns estudis apunten, però, cap a una cooperació dels dos receptors per aconseguir certs efectes biològics, sobretot pel que fa a la inducció de citotoxicitat o apoptosi (*Weiss T, 1997*). En un principi s'havia proposat que el TNFR2, més que transduir el senyal, estaria implicat en un mecanisme de pas de lligant del TNF $\alpha$  al TNFR1, que seria el que realment transmetria el senyal (*Tartaglia L, 1993*). Nous estudis, però, suggereixen que en moltes situacions el TNFR2 actua mitjançant el seu domini intracel·lular com un senyal additiu al TNFR1 (*Declercq W, 1998*).

S'han descrit dues formes solubles del receptor (sTNFR1 i sTNFR2) que es generen a partir de la proteòlisi de les regions extracel·lulars dels receptors per un mecanisme anomenat "shedding" (*Brakebusch, 1994*). Les formes solubles presenten major afinitat pel TNF $\alpha$  que els seus homòlegs de membrana, de forma que s'estableix entre ells una competència per al lligant que modula l'acció del TNF $\alpha$ . No obstant això, també s'ha proposat per les formes solubles (sTNFRs) un paper potenciador de l'acció del TNF, per preveure així la dissociació de l'homotrímer (*Aderka D, 1992*), o la generació d'una resposta cel·lular específica.

#### **1.3.4. ELS GENS DEL TNFR1 I TNFR2**

Els gens que codifiquen el TNFR1 i el TNFR2 han estat mapats a les regions 12p13 i 1p36.2, respectivament (*Baker E, 1991*), (*Kemper O, 1994*), i presenten una organització genòmica molt semblant: els dos tenen una longitud similar i el mateix nombre d'exons (*Christian, 1996*).

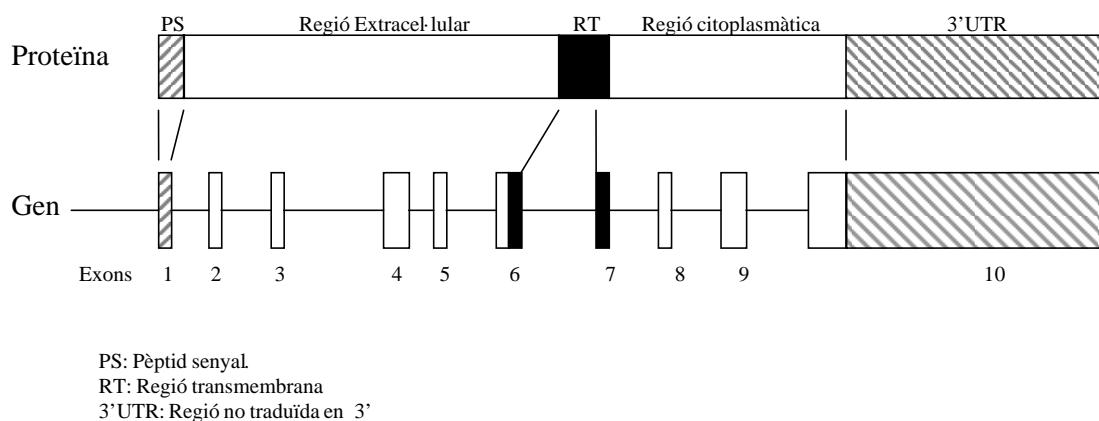
El gen del TNFR2 té una longitud d'aproximadament 26 kb, i està format per 10 exons, 9 introns, la regió promotora i la regió 3' no traduïda. Les longituds dels introns i exons estan ben determinades, així com els nucleòtids, que formen les zones donadores i acceptadores de cada un d'ells. Els exons presenten un rang de longitud entre 35 i 2489 pb i els introns, d'entre 338 i 7500 pb.



Existeix una correlació entre l'organització genòmica del TNFR2 i l'organització funcional de la proteïna. L'exó 1 conté el pèptid senyal i les seqüències N-terminal, mentre que la regió rica en cisteïnes del domini extracel·lular és distribuïda des de l'exó 2 al 6. La regió transmembrana és codificada per una part de l'exó 6 i l'exó 7 i el domini intracel·lular pels exons 8, 9 i 10 (figura 5). La posició de la proteòlisi que produeix les formes solubles del receptor s'ubica dins de l'exó 6, on s'ha identificat el codó que codifica la prolina 211, aminoàcid essencial perquè es produeixi el "shedding" (*Charlotte H, 1998*).

El promotor conté seqüències específiques per a la unió de factors de transcripció com el NF-kB, factor de regulació de l'interferó (IRF-1), llocs g d'activació d'interferó (GAS), elements de resposta a AMP o el factor de transcripció Ikaros. També s'ha observat la presència d'una inusual zona rica en GC.

**Figura 5.** Esquema de l'estructura del gen-proteïna del TNFR2



### 1.3.5. ACCIONS DEL TNF $\alpha$ SOBRE EL METABOLISME. ESTUDIS “IN VIVO” I “IN VITRO” SOBRE ANIMALS D’EXPERIMENTACIÓ

#### 1.3.5.1. Accions del TNF $\alpha$ sobre el metabolisme lipídic

Des del descobriment de la citocina es va especular sobre la seva relació sobre el metabolisme (*Beutler B, 1988*). En diversos estudis en models animals s’ha demostrat que el TNF $\alpha$  pot exercir funcions sobre el sistema nerviós central, la regulació del metabolisme intermediari i el balanç calòric en els teixits adipós, muscular i hepàtic.

El TNF $\alpha$  és sintetitzat en el teixit adipós tant en rates com en humans i en menor grau en els teixits muscular esquelètic i cardíac. En el teixit adipós s’han descrit nombroses evidències del paper d’aquesta citocina sobre el metabolisme lipídic.

S’ha observat tant “in vitro” com “in vivo”, sobre animals d’experimentació que l’administració de la citocina pot contribuir a augmentar els nivells circulants d’àcids grassos mitjançant tres accions. D’una banda, el TNF $\alpha$  és capaç d’estimular la via metabòlica de la lipòlisi, cosa que permet un augment dels àcids grassos lliures a la circulació (*Kawakami M, 1987*), (*Miles PD, 1997*). D’altra banda, el TNF pot inhibir l’activitat i l’expressió de l’enzim lipoproteïna lipasa (LPL) (*Hauner H, 1995*), (*Semb H, 1987*), enzim responsable de la captació dels àcids grassos lliures de la circulació al teixit. Més recentment s’ha demostrat que la citocina pot disminuir l’expressió de certs transportadors d’àcids grassos (com el FATP i el FAT) en el teixit adipós (*Memon RA, 1998*).

A més a més, el TNF $\alpha$  actua també disminuint l’expressió de gens que codifiquen per enzims claus en la via metabòlica de la lipogènesi, com l’acetil-Coa-carboxilasa, o l’àcid gras sintetasa (*Pape ME, 1988*), (*Doerrler W, 1994*).

Finalment, diferents estudis han demostrat que el TNF $\alpha$  estimula també la lipogènesi hepàtica (*Semb H, 1987*), (*Krauss RM, 1990*) i (*Fiengold KR 1990*).

### 1.3.5.2. Accions del TNF $\alpha$ sobre el metabolisme de la glucosa i acció de la insulina

El TNF $\alpha$ , igual que altres citocines com la interleucina un (IL-1) i el IFN- $\gamma$ , també té un paper important en l'homeòstasi de la glucosa. En rates a les quals s'ha administrat via parental i de forma crònica la citocina, aquesta és capaç de perjudicar l'acció de la insulina sobre la disposició de la glucosa en el cos i suprimir la producció de glucosa hepàtica (*Lang CH, 1992*). Un efecte similar s'ha observat en experiments amb gossos, cosa que va advertir d'un paper del TNF $\alpha$  en la inducció de resistència a la insulina perifèrica (*Evans DA, 1989*).

En aquest sentit, en cultius d'adipòcits d'animals incubats amb TNF $\alpha$ , alguns autors han observat la inhibició de l'expressió del transportador Glut-4 i del contingut intracel·lular Glut-1 (*Stephens JM, 1991 i 1992*). Altres estudis han descrit que l'administració de la citocina en cèl·lules musculars i adipòcits inhibeix l'activitat i l'expressió de receptors d'insulina i dona lloc a una disminució de la captació de la glucosa per el teixits perifèrics (*Charron MJ, 1990*).

Atesos aquests efectes sobre l'acció de la insulina, alguns investigadors han examinat els efectes del TNF $\alpha$  en passos molt pròxims al senyal de la insulina. Com s'ha descrit en l'apartat de l'acció de la insulina, el seu senyal comença amb l'autofosforilació del seu receptor i es transdueix per cascades de fosforilacions de diversos substrats com el de tipus 1 (IRS-1), que pot considerar-se el principal mediador del seu senyal. Diverses evidències sostenen que el TNF $\alpha$  pot alterar l'activitat del receptor d'insulina i provocar una disminució del consum de glucosa cel·lular regulat per insulina.

D'una banda, l'exposició crònica de la citocina en cultius d'adipòcits 3T3-L1 causa inhibició segons la dosi de l'autofosforilació del receptor insulínic i de la fosforilació en residus tirosina de l'IRS-1 (*Hotamisligil GS, 1994*), (*Hotamisligil GS, 1996*). Efectes similars han estat observats en cultius de cèl·lules hepàtiques de rata (*Feinstein R, 1993*). Guo D descriu el mateix efecte sobre l'IRS-1 també en cultius 3T3-L1, però al cap de 30 minuts o menys d'incubar-los amb TNF $\alpha$ , i implica altres proteïnes del senyal de la insulina com la fosfatidilinositol-3-quinasa (*Guo D, 1996*).

Un efecte candidat a provocar disminució neta en el senyal de la insulina és un increment en la fosforilació en els residus serina/treonina (Ser/Thr) de l'IRS-1. Aquest tipus de fosforilació s'ha observat en resposta al TNF $\alpha$  (*Hotamisligil GS, 1996*), (*Paz K, 1997*). Aquest efecte és molt interessant, ja que s'ha descrit una forta correlació entre la resistència a la insulina i la fosforilació en aquest residu i perquè perturbacions com la hiperinsulinèmia que provoquen un increment d'aquesta fosforilació poden atenuar el senyal d'insulina.

El mecanisme molecular exacte pel qual el TNF $\alpha$  indueix aquests tipus de fosforilacions no és clar, però alguns estudis han suggerit que isoformes de la proteïna quinasa C hi són implicades (*Kellerer M, 1998*).

En canvi, els treballs realitzats per Stephens JM i altres suggereixen que la principal raó per la qual el senyal d'insulina és reduït en resposta a una exposició crònica de TNF $\alpha$  és la inhibició de l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes substrats del receptor d'insulina i del receptor de la insulina (*Stephens JM, 1997*).

Quan s'han realitzat estudis per observar l'efecte de la neutralització del TNF $\alpha$  (en rates Zucker obeses i diabètiques) mitjançant l'administració d'un anticòs anti-TNF $\alpha$ , s'ha confirmat que provocava una millora de l'activitat del receptor insulínic tant en el múscul com en el teixit adipós, i, per tant, una millora de la disposició de glucosa regulada per insulina per aquests teixits. En canvi, no s'apreciaven variacions significatives en l'activitat dels receptors hepàtics. El fet que la millora en la sensibilitat a la insulina es doni només en aquells teixits que sobreexpressen aquesta citocina, va suggerir que molt probablement el TNF $\alpha$  actuï de forma autocrina o paracrina sobre el mateix teixit.

A la taula 2 resumim els mecanismes descrits anteriorment.

**Taula 2.** Mecanismes d'acció del TNF $\alpha$  sobre el metabolisme lipídic i el de la glucosa

<b>SOBRE EL METABOLISME LIPÍDIC</b>	
<b>Mecanisme proposat</b>	<b>Referència</b>
Activació lipòlisi. Augment AGL	Milles PD, 1997
Activació lipogènesi hepàtica	Kraus RM, 1990
Inhibició activitat i expressió de la LPL. Augment AGL	Hauner H, 1995
Inhibició expressió transportadors dels AGL	Memon RA, 1998
Inhibició expressió enzims lipogènesi adipocitària	Doerrler W, 1994
<b>SOBRE EL METABOLISME DE LA GLUCOSA.</b>	
<b>Mecanisme proposat</b>	<b>Referència</b>
Inhibició expressió del Glut-1 i el Glut-4	Stephens JM, 1992
Inhibició expressió d'IRS i receptor d'insulina	Stephens JM, 1997
Inhibició de l'autofosforilació del receptor d'insulina	Hotamisligil GS, 1994
Increment de fosforilació en Tyr i en Ser/Thr de l'IRS-1	Hotamisligil GS, 1996

### 1.3.5.3. Estudis genètics amb models de rates “knock-out”

Potser l'evidència més definitiva del paper del TNF $\alpha$  en la sensibilitat a la insulina sobre tot en l'estat de l'obesitat i diabetis, són els estudis genètics en ratolins mancats del gen del TNF $\alpha$ , d'algun dels seus dos receptors o d'ambdós receptors alhora. Aquest tipus d'estudis s'anomenen estudis “knock-out” per al gen que ha estat suprimida la seva activitat. En els treballs que es descriuran a continuació s'estudia l'efecte de la pèrdua de la funció d'aquests gens en diferents models de rates amb obesitat i en alguns casos també amb diabetis. L'obesitat és induïda als animals genèticament, mitjançant l'eliminació del gen de la leptina (ob), amb dieta, per mitjà d'una alimentació amb una dieta hipercalòrica o bé químicament, amb la injecció de substàncies químiques que produeixen hiperfàgia. La diabetis s'aconsegueix amb la supressió del gen del receptor de la leptina (db).

a) Estudis “knock-out” per al gen del TNF $\alpha$

Ventre J i Uysal K demostren de forma independent (*Ventre J, 1997 i Uysal K, 1997*) que la funció del TNF $\alpha$  en rates proporciona una millora de la tolerància a la glucosa i de la hiperinsulinèmia. Així, la manca de la citocina confereix una protecció considerable a la resistència a la insulina durant l'obesitat, tant en les rates amb obesitat induïda per dieta (en el cas de l'estudi d'Uysal) com en l'obesitat induïda químicament (estudi de Venter). No obstant això, la protecció que confereix la pèrdua de funció d'aquest gen sobre la resistència a la insulina no és absoluta, cosa que fa pensar als autors en la implicació d'altres factors encara no identificats com a mediadors d'aquest desordre i, per tant, de l'etiologia multifactorial de la resistència a la insulina a l'obesitat.

Els dos estudis anteriors també demostren que el TNF $\alpha$  pot influir en la sensibilitat a la insulina mitjançant les seves accions en diversos passos involucrats en l'acció de la insulina, com ara són el transport de la glucosa, la producció de leptina i, el senyal del receptor de la insulina, o també sobre el metabolisme de lípids.

D'un altra banda, altres investigadors sostenien la hipòtesi sobre el paper fisiològic del TNF $\alpha$  com a factor restrictiu de l'increment del teixit adipós (*Hotamisligil G, 1994*). Els resultats de Ventre i Uysal no són consistents amb aquesta hipòtesi, ja que en els dos estudis el grau d'obesitat assolit pels animals sense la funció de la citocina era pràcticament igual a l'obesitat assolida pels animals controls.

b) Estudis “knock-out” per als gens dels receptors R1 i R2 del TNF $\alpha$

Pel que fa a la investigació en “knock-out” per als gens dels receptors R1 i R2, existeixen discrepàncies entre els resultats dels estudis publicats. D'una banda Shereyer S, (*Shereyer S, 1998*) descriu que els ratolins amb pèrdua de funció per algun dels dos receptors presenten poques o cap diferència pel que fa al desenvolupament de l'obesitat i a la tolerància a la glucosa. Sorprenentment, però,

en el cas dels ratolins que han perdut les dues funcions dels receptors alhora presenten una relativa hiperinsulinèmia i hiperglucèmia, de forma que la pèrdua de funció d'ambdós receptors sembla que està associada a un aparent foment de resistència a la insulina.

En contrast amb els resultats de Shereyer, un estudi realitzat per Uysal K, (*Uysal K, 1997*) amb ratolins “knock-out” amb pèrdua de funció dels dos receptors alhora revela protecció parcial contra el desenvolupament d'hiperglicèmia i hiperinsulinèmia, i contra una resposta inferior a la glucosa i insulina exògena. Així, aquest autor descriu que la pèrdua de funció d'ambdós receptors sembla que està associada a una aparent protecció per desenvolupar resistència a la insulina.

En un estudi posterior, aquest mateix autor (*Uysal K, 1998*) descriu el TNFR1 com el receptor del TNF $\alpha$  predominant en la regulació l'acció d'aquesta citocina sobre la sensibilitat a la insulina en el seu model animal de rates obesas.

Les raons de les discrepàncies entre els resultats de Shereyer i els d'Uysal, romanen per dilucidar. La principal diferència entre el model animal “knock-out” per ambdós receptors estudiat pels dos autors és que, en el cas de Shereyer, l'obesitat en les rates era induïda amb una dieta hipercalòrica; en canvi, en el model animal d'Uysal l'obesitat és induïda genèticament, eliminant el gen de la leptina. Els autors, però, a més a més d'aquesta diferència, atribueixen les causes de la discrepància a la possible intervenció d'altres factors que regulen accions sobre la sensibilitat a la insulina, tal com hem comentat anteriorment en els models “knock-out” per al TNF $\alpha$ .

Sembla clar, doncs, que el tipus de model animal i la forma d'inducció d'obesitat-diabetis és clau a l'hora d'interpretar i entendre els mecanismes d'acció d'aquesta citocina i dels seus receptors en la inducció de resistència a la insulina.

Un resum dels resultats dels estudis “knock-out” per al TNF $\alpha$  i per els receptors R1 i R2 es presenta a la taula 3, extreta de Moller DE (*Moller, DE, 2000*)

**Taula 3.** Estudis “knock-out” per al gen del TNF $\alpha$  i per als seus receptors

ob: gen de la leptina.

db: receptor de la leptina.

<b>ESTUDIS “KNOCK-OUT” PER AL GEN DEL TNF<math>\alpha</math> (TNF -/-)</b>		
<b>MODEL ANIMAL</b>	<b>FENOTIP METABÒLIC</b>	<b>REFERÈNCIA</b>
<b>Obesitat induïda químicament</b>		
Rata TNF -/-	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les obeses presenten millora parcial de tolerància a la glucosa i de la hiperinsulinèmia</li> <li>- Aparent protecció de resistència a la insulina</li> </ul>	Ventre J, 1997
<b>Obesitat induïda per dieta calòrica</b>		
Rata TNF-/-	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obesitat menys pronunciada i més resistent a la hiperinsulinèmia i a la intolerància a la glucosa</li> <li>- Aparent protecció de resistència a la insulina</li> <li>- Nivells àcids grassos lliures baixos</li> </ul>	Uysal K, 1997

<b>ESTUDIS “KNOCK-OUT” PER AL GEN DEL RECEPTOR R1 (TNFR1 -/-), O RECEPTOR R2 (TNFR2 -/-) I PER A AMBDÓS GENS</b>		
<b>MODEL ANIMAL</b>	<b>FENOTIP METABÒLIC</b>	<b>REFERÈNCIA</b>
<b>Obesitat induïda per dieta calòrica</b>		
Rata TNFR1 -/-	- Obesitat i tolerància a la glucosa semblant als controls	Schreyer S, 1998
Rata TNFR2 -/-	- Guany de pes reduït versus controls i nivells d’insulina inferiors als controls	Schreyer S, 1998



<b>MODEL ANIMAL</b>	<b>FENOTIP METABÒLIC</b>	<b>REFERÈNCIA</b>
Rata TNFR1-/- TNFR2-/-	- Obesitat semblant als controls - Nivells d'insulina i glucosa més elevats - Aparent foment de resistència a la insulina.	Schreyer S, 1998
<b>Obesitat induïda genèticament (rata ob/ob)</b>		
Rata TNFR1-/-	- Aparent protecció de resistència a la insulina - TNFR1 com a principal mediador	Uysal K, 1998
Rata TNFR1-/-TNFR2 -/-	- Obesitat semblant als controls - Parcial protecció d'hiperglucèmia i hiperinsulinèmia - Aparent protecció de resistència a la insulina	Uysal K, 1997
<b>Diabetes induïda genèticament (rata db/db)</b>		
Rata TNFR1 -/-	- Cap diferència amb les rates de controls.	Schreyer S, 1998

### **1.3.6. EL TNF $\alpha$ COM A MEDIADOR DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA ALS HUMANS**

Tot i que el paper del TNF $\alpha$  sobre el metabolisme basal i la sensibilitat a la insulina en situacions d'obesitat i diabetis ha estat àmpliament documentada sobre estudis "in vitro" i "in vivo" en models d'animals, en els humans aquestes implicacions de la citocina són menys conegudes. Això es deu no només a la complexitat dels mecanismes involucrats, sinó també a la dificultat metodològica per estudiar el TNF $\alpha$ . Aquestes dificultats s'atribueixen a l'elevat grau de labilitat que la citocina presenta durant el processament i la manipulació de la mostra. Així, la detecció dels valors plasmàtics en humans és laboriosa i de fet en la literatura existeix discrepància en les seves valoracions.

Diversos estudis en humans donen suport a la hipòtesi que el TNF $\alpha$  podria tenir un paper important en la inducció a la resistència a la insulina a l'obesitat o a la DM2 en els humans. En aquest sentit, primer comentarem les troballes d'aquesta relació en l'àmbit d'expressió de la citocina en teixits concrets i després les publicades en l'àmbit de les variacions en el gen del TNF $\alpha$ .

### **1.3.6.1. Expressió del TNF $\alpha$ en teixit adipós i muscular humà i resistència a la insulina**

En els treballs als quals farem referència, la quantificació de l'expressió de la citocina en el teixit adipós i muscular es determina amb l'extracció del mRNA de la citocina a partir del tractament d'una biòpsia del teixit.

Kern PA i Hotamisligil GS demostren de forma independent que en el teixit adipós de pacients obesos hi ha un augment de l'expressió del TNF $\alpha$  respecte als mateixos tipus cel·lulars dels individus amb d'absència d'obesitat. (*Kern PA, 1995 i Hotamisligil GS, 1995*) Igualment, Saghizadeh M observa un augment de l'expressió de la citocina en el teixit muscular de pacients diabètics respecte a les cèl·lules dels individus normoglicèmics (*Saghizadeh M, 1996*).

Els estudis esmentats anteriorment mostren una important relació entre l'expressió tissular i certes variables relacionades amb la sensibilitat a la insulina. Així, l'expressió de TNF $\alpha$  en els pacients obesos es correlaciona positivament amb els nivells d'insulina plasmàtica i amb l'índex de massa corporal. També l'expressió de TNF $\alpha$  presenta una correlació inversa amb l'activitat i l'expressió de l'enzim LPL adipocitària. Amb la pèrdua de pes dels pacients obesos, l'expressió de la citocina decreix, millora la sensibilitat a la insulina i es recupera l'activitat de l'enzim LPL. Resultats similars s'observen en mesurar els nivells de la citocina plasmàtica, però els autors adverteixen que les concentracions són molt baixes o quasi indetectables, cosa que dificulta la interpretació dels resultats.

Pel que fa al teixit muscular dels individus diabètics, els increments de l'expressió de la citocina en aquests pacients s'associaven fortament amb l'augment de glucosa disponible en el medi.

### 1.3.6.2. Variacions en el gen del TNF $\alpha$ humà i resistència a la insulina

Un dels primers estudis que va establir una possible relació entre aquest gen i l'obesitat va ser descrit en una població d'índis Pima obesos. Aquí, l'autor estableix un lligament entre un marcador genètic prop del gen del TNF $\alpha$  i l'obesitat. Posteriorment es varen identificar polimorfismes en el promotor del gen del TNF $\alpha$ , concretament en les posicions -238 i -308, ambdós causats per un canvi de guanina per adenina (*Wilson AG, 1992*) i (*D'Alfonso S, 1994*). Diversos treballs en diferents models cel·lulars humans estudien el significat funcional d'aquests polimorfismes. Alguns grups d'investigadors coincideixen en què, en el polimorfisme -308, el canvi per adenina o al·lel TNF2 s'associa a una taxa de transcripció constitutiva i induïda de TNF $\alpha$  més alta respecte a l'al·lel TNF1 (*Wilson AG, 1997*), (*Kroeger KM, 1997*) i (*Wu WS, 1997*). En canvi, altres grups no troben cap diferència en la taxa de transcripció d'aquests dos al·lells (*Stuber F, 1995-96*) i (*Brinkman BM, 1995-96*). Aquestes discrepàncies sembla que estan relacionades amb el model de cultiu cel·lular, els estimulants per la síntesi de la citocina i de l'estructura del gen que s'usa en els experiments.

Així doncs, s'obria la possibilitat que aquestes variacions juguessin un paper determinant "in vivo" sobre l'acció del TNF $\alpha$  en la resistència a la insulina. Utilitzant aquesta hipòtesi, es va dur a terme un estudi en humans del polimorfisme genètic en la posició -308 del TNF $\alpha$ , i es va demostrar per primer cop, una relació entre aquest polimorfisme, la sensibilitat a la insulina i l'obesitat (*Fernandez-Real JM, 1997*). En aquest estudi, els individus portadors de l'al·lel TNF2 presenten un percentatge major de massa grassa acompanyada de nivells més elevats de leptina i un augment de resistència a la insulina en comparació amb els individus del mateix sexe, edat, índex de massa corporal i relació cintura/maluc que no són portadors d'aquest al·lel.

### 1.3.6.3. Els receptors R1 i R2 del TNF $\alpha$ i resistència a la insulina

El treball més rellevant a nivell humà sobre l'expressió dels dos receptors i aquesta relació amb l'obesitat és el publicat per Hotamisligil GS (*Hotamisligil GS, 1997*). Aquest

treball demostra que les dones obeses expressen el doble de mRNA del receptor 2 en el teixit adipós i sis cops més fracció soluble d'aquest receptor en circulació en relació amb les dones primes. L'expressió del receptor 2 en aquest teixit es correlaciona fortament amb l'índex de massa corporal i els nivells d'insulinèmia. En canvi, tant l'expressió del receptor 1 com els seus nivells circulants són similars en tots els individus involucrats en l'estudi.

## **1.4. LA INTERLEUCINA-6**

### **1.4.1. SÍNTESI I ESTRUCTURA PROTEICA**

La interleucina 6 (IL-6) va ser originalment identificada com un factor de diferenciació cel·lular (BSF-2) que induïa la maduració final de les cèl·lules T (*Hirano T, 1985*). Una sèrie d'estudis posteriors confirmaven que aquesta citocina es sintetitza en diversos tipus de cèl·lules del sistema immune i de cèl·lules accessòries d'aquest sistema (com monòcits, macròfags, limfòcits, fibroblast, cèl·lules endotelials, etc.). Així, la IL-6 és una de les principals citocines moduladores de la resposta inflamatòria: inhibeix la síntesi de TNF- $\alpha$  i l'IL-1, activa la síntesi hepàtica de proteïnes de fase aguda i estimula l'eix hipotalàmic-pituitari-adrenal (*Schindler R, 1990*), (*Heinrich PC, 1990*) i (*Lyson K, 1991*).

Aquesta citocina és sintetitzada també en cèl·lules no immunitàries i òrgans com l'osteoblast, els queratinòcits, els condròcits, les cèl·lules de l'epiteli intestinal, les cèl·lules de Leydig, els adipòcits, etc. Es caracteritza per ser marcadament pleitròpica i participar en la regulació de diverses funcions metabòliques i endocrines.

La producció d'IL-6 es regulada positivament o negativament per diversos estímuls segons els tipus cel·lular. En presència de lipopolisacàrids, diferents virus i diverses citocines (TNF, factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), interferó  $\beta$ ) s'activa la síntesi d'aquesta citocina, mentre que en presència de glucocorticoides s'inhibeix.

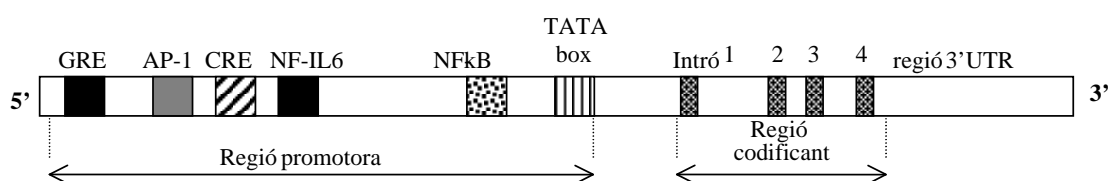
L'estructura proteica de la interleucina-6 consisteix en 184 aminoàcids amb dos llocs potencials de glicosilació i quatre residus cisteïna, aquests darrers altament conservats en l'evolució i amb un paper crític per a l'activitat de la citocina.

### **1.4.2. ESTRUCTURA DEL GEN DE LA IL-6**

El gen es localitza al braç curt del cromosoma 7, concretament a la regió 7p21-p15 (*Ferguson-Smith AC, 1988*). Consisteix en 5 exons i 4 introns i presenta una complexa regulació de la seva transcripció. El promotor del gen conté diversos llocs de reconeixement per a factors de control de la transcripció com el factor nuclear de la IL-6 (NF-IL6), que pertany a la família C/EBP, el factor NF- $\kappa$ B, que és el major mediador de

l'estímul inflamatori (*Matsusaka T, 1993*) i d'altres com elements de resposta a glucocorticoides (GRE), elements de resposta a AMP (CRE) i activadors de proteïnes d'unió 1 (AP-1) (figura 6).

**Figura 6.** Esquema de l'estructura del gen de la IL-6



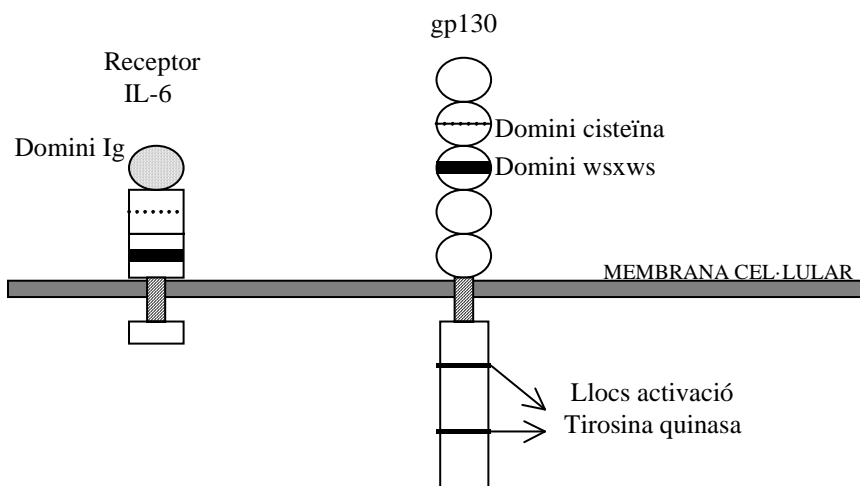
### 1.4.3. RECEPTOR DEL LA IL-6. ESTRUCTURA I TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL

#### 1.4.3.1. Estructura del receptor de la IL-6 i del gp130

Es tracta d'un receptor de membrana amb les regions típiques: extracel·lular, transmembrana i intracel·lular. A la regió extracel·lular s'hi diferencia una porció d'aproximadament 100 aminoàcids d'un domini que pertany a la superfamília d'immunoglobulines i que no sembla important per a la unió del lligand IL-6. La segona porció conté els dominis que caracteritzen aquesta família de receptors: 4 residus cisteïna i un motiu Triptòfan-Serina-X-Triptòfan-Serina (WSXWS), aquest darrer amb funció d'interacció amb la IL-6 (*Miyajima A, 1992*).

La regió intracel·lular conté només 80 aminoàcids i està mancada de qualsevol motiu conegut per transduir el senyal. Per aquest darrer motiu la unió de la IL-6 al seu receptor s'associa a una molècula de 130-kDa anomenada gp130, que és la que transdueix el senyal cap a la cèl·lula. Gp130 també és una proteïna transmembrana. La regió extracel·lular conté motius típics d'una família de receptors de citocines, descrits anteriorment, però la regió intracel·lular conté llocs intrínsecs d'activació tirosina-quinasa (figura 7).

**Figura 7.** Esquema de l'estructura del receptor de la IL-6 i el gp130

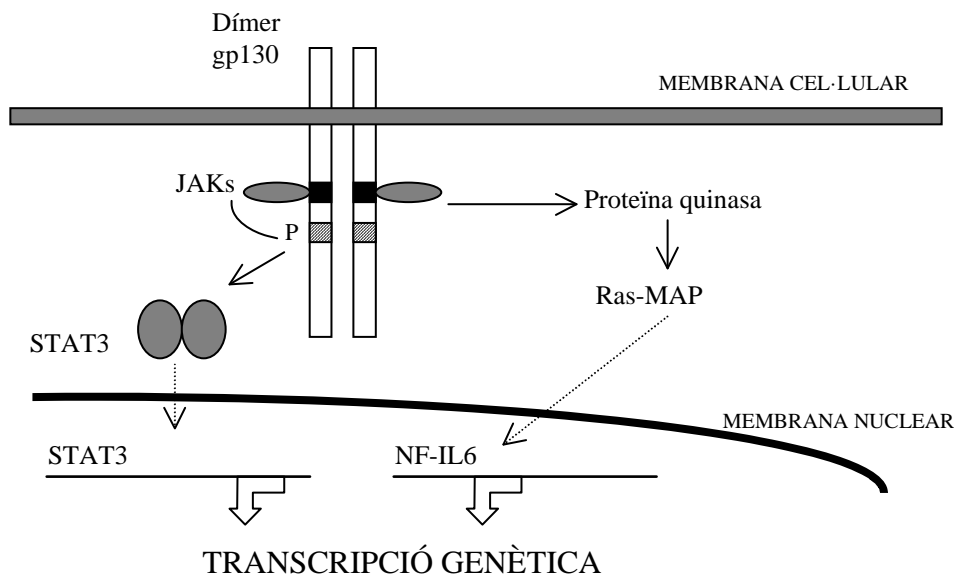


#### 1.4.3.2. Mecanisme de transducció del senyal per mitjà de gp130

L'estimulació de la IL-6 mitjançant la unió amb el seu receptor de membrana o amb la fracció soluble del receptor sembla que indueix l'homodimerització de la proteïna gp130. A conseqüència d'aquesta unió s'activen proteïnes JAK-quinases (JAKs) que permeten la fosforilació en tirosina de la part més distal de la regió intracel·lular del gp130, cosa que permet la dimerització de proteïnes STAT3. Aquestes darreres proteïnes són translocades cap al nucli per modular l'expressió de gens, com els que codifiquen per a proteïnes de fase aguda.

Un altra via d'activació de gens de proteïnes de fase aguda, mitjançant IL-6 i gp130, és per l'activació d'una proteïna tirosina-quinasa encara no identificada seguida de cascades quinasa Ras-MAP i que finalitza amb l'activació del factor de transcripció NF-IL6 (figura 8).

**Figura 8.** Esquema de la transmissió dels senyals de la IL-6



#### 1.4.4. ACCIONS DE LA IL-6 SOBRE EL METABOLISME. ESTUDIS “IN VIVO” I “IN VITRO” SOBRE ANIMALS D’EXPERIMENTACIÓ.

S’ha demostrat que la IL-6 redueix l’activitat de l’enzim LPL adipocitària tant “in vivo”, en el teixit adipós de ratolí, com “in vitro”, sobre cultius de cèl·lules 3T3-L1 (Greenberg AS, 1992). També en rates s’ha observat que l’administració intravenosa d’IL-6 indueix una hipertrigliceridèmia de forma dosi-dependent mitjançant l’estimulació de la secreció de triglicèrids al teixit hepàtic (Nonogaki K, 1995).

##### 1.4.4.1. Paper de la IL-6 sobre el metabolisme en humans

En els humans hi ha pocs estudis sobre els possibles efectes de la IL-6 sobre el metabolisme lipídic o sobre la glucosa en individus obesos o amb DM2. Fins a la publicació dels nostres articles sobre la IL-6 (estudis 3 i 4), els estudis “in vitro” i “in vivo” demostren que la IL-6 és secretada tant pel teixit adipós humà subcutani com visceral. La secreció d’aquesta citocina s’ha observat més elevada en individus obesos i els nivells



circulants d'IL-6 es correlacionen fortament amb marcadors d'obesitat com el BMI, la raó cintura maluc (WHR, "waist-hip ratio") i el percentatge de massa grassa (*Vgontzas AN, 1997*), (*Mohamed-Ali V, 1997*). També l'administració d'IL-6 sembla que està associada a un augment en la circulació d'àcids grassos lliures (*Stouthard JM, 1995*).

S'ha proposat que aquesta citocina pot tenir un paper en la modulació del metabolisme de la glucosa en el teixit adipós en una situació d'ingesta. En aquest sentit, *Orban Z* demostra que els nivells d'IL-6 en el fluid intrastencial de teixit adipós subcutani augmenten postprandrialment i ho fan de forma paral·lela amb els nivells de glucosa i els d'insulina (*Orban Z, 1999*).

D'altra banda, la IL-6, junt amb el TNF $\alpha$  i la IL-1, és la màxima responsable de la modulació de la transcripció dels gens que codifiquen per les proteïnes de resposta de fase aguda en el fetge. Aquestes proteïnes augmenten o disminueixen els seus nivells circulants en situacions d'infeccions agudes, traumatismes o neoplàsies per tal de restablir l'homeòstasi. Aquestes situacions s'acompanyen d'una dislipèmia típica i molt semblant a la que s'observa en els individus amb DM2: hipertrigliceridèmia, augment de VLDL i disminució de les HDL i LDL inalterades. Alguns autors donen suport a la hipòtesi que la IL-6 és la responsable d'aquestes anomalies lipídiques que es donen en els individus amb DM2 i, sobretot, en aquells amb més característiques de la síndrome metabòlica. Aquesta hipòtesi esmentada es basa en el fet que diferents autors han demostrat un augment en la circulació d'aquests pacients de proteïnes de fase aguda (proteïna C reactiva, cortisol, fibrinogen, etc.) paral·lelament amb la dislipèmia típica de la malaltia (*Pickup JC, 1997*).

#### 1.4.4.2. Estudis genètics de la IL-6 en humans.

D'altra banda, també són limitats els estudis genètics i els estudis d'associació de polimorfismes d'aquesta citocina en la població humana. Només un estudi en individus anglesos analitza la regió promotora del gen. Els autors citen un polimorfisme en la posició -174 provocat per un canvi degut a una transverssió G>C i observen una associació de l'al·lel G a taxes de transcripció del gen més elevades (*Fishman D, 1998*).

## **2. OBJECTIUS**

Els objectius plantejats en els treballs que formen aquesta tesi són els següents:

### **ESTUDI 1.**

**Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. Diabetes 47:1757-62, 1998.**

- 1- Analitzar el paper de les fraccions solubles circulants dels receptors 1 i 2 del TNF $\alpha$  en la possible mediació a resistència a la insulina en una població obesa.
- 2- Determinar la correlació entre les fraccions solubles circulants dels dos receptors i certs marcadors d'obesitat i resistència a la insulina.

### **ESTUDI 2.**

**Polymorphism of the tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. Diabetes Care 23:831-37, 2000.**

- 1- Analitzar genèticament la regió no traduïda (3' UTR) del gen del receptor 2 del TNF $\alpha$ .
- 2- Avaluar si les variacions trobades participen en la predisposició genètica a obesitat o a determinats factors de risc.

### **ESTUDI 3.**

**Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. Diabetes 49:517-20, 2000.**

- 1- Analitzar el polimorfisme C>G en la posició -147 del promotor del gen de la interleucina 6 en la possible participació en la predisposició genètica al grau de resistència a la insulina en una població sana.

#### **ESTUDI 4.**

**Interlekin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. J Clin Endocrinol Metab 85:1334-39, 2000.**

- 1- Analitzar el polimorfisme C>G en la posició - 147 del promotor del gen de la interleucina 6 sobre la seva possible participació en la predisposició genètica a presentar anomalies en els nivells cíclics dels paràmetres lipídics en una població sana .

### **3. MATERIALS I MÈTODES**

## **MATERIALS I MÈTODES**

### **3.1. SUBJECTES MOTIU D'ESTUDI**

1.1 Estudi 1: població control i obesa

1.2 Estudi 2: població control i amb diabetes mellitus tipus 2

1.3 Estudi 3 i 4: població sana

### **3.2. RECOLLIDA DE DADES**

- Paràmetres clínics
- Paràmetres antropomètrics. Avaluació de la composició corporal
- Paràmetres metabòlics
- Paràmetres genètics

### **3.3. DESCRIPCIÓ DE LA METODOLOGIA**

- Paràmetres clínics
- Paràmetres antropomètrics
- Paràmetres metabòlics
- Paràmetres genètics

### **3.4. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES**

### **3.1. SUBJECTES MOTIU D'ESTUDI**

Les poblacions estudiades són d'origen caucasià. Els individus estudiats i les seves dues generacions prèvies procedents de la conca mediterrània. Els individus amb obesitat o amb diabetis mellitus tipus 2 van ser diagnosticats per el serveis d'endocrinologia de l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona i per l'Hospital Dr. Josep Trueta de Girona. Les poblacions control es van seleccionar per a cada estudi dins del mateix ambient que els pacients. Previ consentiment informat, els subjectes varen acceptar la seva participació voluntària en els estudis. Els projectes han estat revisats i aprovats per el Comitè d'Investigació i Ètica d'ambdós hospitals.

#### **3.1.1. ESTUDI 1.**

**PLASMA LEVELS OF THE SOLUBLE FRACTION OF TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 2 AND INSULIN RESISTANCE. Diabetes 47:1757-62, 1998.**

##### **Població Control (n = 16)**

###### *Críteris d'inclusió:*

- Pes estable al menys tres mesos abans de l'estudi.
- Índex de massa corporal < 27 Kg/m<sup>2</sup> (homes).  
< 25 Kg/m<sup>2</sup> (dones)
- Normotensos i Normolipídics.
- Absència de malaltia sistèmica i metabòlica, de qualsevol infecció i de tractament amb fàrmacs.

**Població Obesa (n=20)** (obesitat moderada o de grau II de Garrow). Diagnosticats segons l'índex de massa corporal (BMI), (*Garrow GS, 1985*).

###### *Críteris d'inclusió:*

- Pes estable al menys tres mesos abans de l'estudi.
- Índex de massa corporal >30 < 40 kg/m<sup>2</sup>.
- Absència de malaltia sistèmica i metabòlica (tret d'obesitat), de qualsevol infecció i de tractament amb fàrmacs.

### 3.1.2. ESTUDI 2.

**POLYMORPHISM OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$  RECEPTOR 2 GENE IS ASSOCIATED WITH OBESITY, LEPTIN LEVELS, AND INSULIN RESISTANCE IN YOUNG SUBJECTS AND DIET-TREATED TYPE 2 DIABETIC PATIENTS. *Diabetes Care* 23:831-37, 2000.**

#### **Població Control (n = 107)**

##### *Criteris d'inclusió:*

- Pes estable tres mesos abans de l'estudi.
- Índex de massa corporal  $< 40 \text{ Kg /m}^2$ .
- Normotensos i Normolipídics.
- Absència de malaltia sistèmica i metabòlica (tret d'obesitat), de qualsevol infecció i de tractament amb fàrmacs.

**Població amb Diabetis Mellitus Tipus 2 (DM2) (n =110).** El diagnòstic de diabetis mellitus tipus 2 es va realitzar segons els criteris del Comitè Expert en el Diagnòstic i Classificació de la Diabetis Mellitus. (*Report of The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetis Mellitus, 1997*).

##### *Criteris d'inclusió:*

- Índex de massa corporal  $< 40 \text{ Kg / m}^2$ .
- Control metabòlic estable durant els 6 mesos previs a l'estudi.
- Sense història de cetoacidosi.

##### *Criteris d'exclusió:*

- Malaltia hepàtica, neurològica, endocrinològica o altres malalties sistèmiques majors, incluint les neoplàsies.
- Història d'abús de drogues o alcohol, definida com a la ingesta de més de 80g. diaris als homes, i més de 40g. a les dones; o bé activitat sèrica de les transaminases augmentada tres cops el límit normal.
- Creatinina sèrica elevada.
- Presència de malaltia cardiovascular aguda durant els 6 mesos previst l'estudi.



- Malaltia aguda i evidència de malaltia inflamatòria o infecciosa crònica o aguda.

### **3.1.3. ESTUDI 3.**

**INTERLEUKIN-6 GENE POLYMORPHISM AND INSULIN SENSITIVITY.  
Diabetes 49:517-20, 2000.**

### **3.1.4. ESTUDI 4.**

**INTERLEUKIN-6 GENE POLYMORPHISM AND LIPID ABNORMALITIES IN  
HEALTHY SUBJECTS. J Clin Endocrinol Metab 85:1334-39, 2000.**

#### **Població Sana (n = 32) (Població per l'estudi 3 i 4)**

##### *Críteris d'inclusió:*

- Pes estable durant al menys tres mesos abans de l'estudi.
- Índex de massa corporal  $< 40 \text{ Kg/m}^2$ .
- Absència de malaltia sistèmica i metabòlica (tret d'obesitat), de qualsevol infecció i de tractament amb fàrmacs.

## **3.2. RECOLLIDA DE DADES ENTRE TOTS ELS ESTUDIS**

### PARÀMETRES CLÍNICS

- Dades de filiació (nom, adreça i telèfon)
- Edat
- Sexe
- Pes
- Alçada
- Índex de massa corporal (BMI, “body mass index”)
- Grau d’obesitat
- Tensió arterial
- Història familiar de diabetes mellitus tipus 2

### PARÀMETRES ANTROPOMÈTRICS (AVALUACIÓ DE LA COMPOSICIÓ CORPORAL)

- Raó Cintura-Maluc (WHR, “waist-hip ratio”)
- Plec bicipital (BSF, “biceps skinfold thickness”)
- Plec tricripital (TSF, (“triceps skinfold thickness”)
- Plec subescapular (SSF, “subscapular skinfold thickness”)
- Plec abdominal (ASF, “abdominal skinfold thickness”)
- Àrea muscular del braç (MAMA, “mid-arm muscle area”)
- Circumferència muscular del braç (MAMC, “mid-arm muscle circumference”)
- Massa grassa i percentatge de massa grassa (FM, “fat mass”)
- Massa magra (FFM, “fat free mass”)

### PARÀMETRES METABÒLICS

- Nivells de Glucosa
- Nivells d’Insulina

- Nivells de colesterol total
- Nivells de lipoproteïnes de molt baixa, baixa i alta densitat (VLDLC, LDLC i HDLC)
- Nivells de triglicèrids i VLDL-triglicèrids
- Nivells d'àcids grassos lliures (FFA, "free fatty acids")
- Nivells d'hemoglobina glicosidada (HbA1c)
- Nivells de les fraccions solubles dels receptors 1 i 2 del TNF (sTNFR1, sTNFR2 o sTNFRs)
- Nivells de interleucina 6 (IL-6)
- Nivells de leptina
- Nivells de globulina (CBG) i globulina glicosidada transportadora de cortisol
- Fórmula leucocitària i recompte de cèl·lules blanques
- Índex de sensibilitat a la insulina ( $S_I$ ) i efectivitat de la glucosa ( $S_G$ )
- Àrea sota la corba d'insulina i de glucosa ( $AUC_{insulina}$  i  $AUC_{glucosa}$ )

## PARÀMETRES GENÈTICS

- Anàlisi de la regió 3' no traduïda (3'UTR) del gen del receptor 2 del factor de necrosi tumoral alfa
- Anàlisi del polimorfisme de restricció G>C a la posició - 174 del gen de la Interleucina 6

### **3.3. DESCRIPCIÓ DE LA METODOLOGIA**

#### **3.3.1. PARÀMETRES CLÍNICS**

##### **3.3.1.1. Índex de Massa Corporal (BMI)**

L'índex de massa corporal equivalent a l'índex de Quetelet (*Quetelet LAS, 1869*) és un paràmetre clínic que està en funció del pes i de l'alçada de l'individu. Es calcula segons la fórmula:

$$\text{BMI} = \text{pes (Kg)} / \text{alçada}^2 (\text{m})$$

##### **3.3.1.2. Grau d'Obesitat**

Es diferencien quatre grups segons el BMI (*Garrow GS, 1985*):

- Normopés o grau de Garrow : BMI < 25 Kg/m<sup>2</sup>
- Sobrepés o grau I de Garrow : BMI entre 25 i 29.9 Kg/m<sup>2</sup>
- Obesitat moderada o grau II de Garrow : BMI entre 30 i 39.9 Kg/m<sup>2</sup>
- Obesitat mòrbida o grau III de Garrow: BMI > 40 Kg/m<sup>2</sup>

##### **3.3.1.3. Determinació de la Tensió Arterial**

Es determina entre les 8 i 9 hores del matí, amb l'individu assegut i després de 5 minuts de repòs. S'utilitza un esfingomanòmetre de mercuri. El primer i cinquè sorolls de Korotkoff foren els indicadors de la pressió arterial sistòlica (TAS) i la diastòlica (TAD), respectivament. La xifra de la tensió arterial calculada per a cada individu va ser la mitjana de tres lectures amb tres minuts d'interval entre elles.

### **3.3.2. PARÀMETRES ANTROPOMÈTRICS. AVALUACIÓ DE LA COMPOSICIÓ CORPORAL**

Per avaluar la composició corporal (grassa corporal total i musculatura esquelètica) es van utilitzar dos mètodes:

- Les mesures antropomètriques.
- L'anàlisi de la impedància bioelèctrica.

#### **3.3.2.1. Mesures Antropomètriques**

El material tècnic es compost de:

- Bàscula clínica estàtica de plataforma amb tallímetre que permet determinar el pes i l'alçada de l'individu de forma consecutiva .
- Cinta mètrica flexible, calibrada en mil·límetres.
- Lipocalibrador Lipocaliper de Holtain®, (Cambridge, Regne Unit), utilitzat per a la mesura dels plecs cutanis.
- Monitor de composició corporal Holtain BC Analyser, per anàlisi de la impedància bioelèctrica.

##### a) Raó Cintura/Maluc (WHR)

D'acord amb Vague (*Vague J, 1947*), la raó cintura/maluc (WHR) es calcula de la forma següent:

$$\text{WHR} = \text{Circumferència de la cintura} / \text{Circumferència del maluc}$$

##### *Circumferència de la cintura*

Es determina la circumferència més estreta possible a nivell periumbilical. Aquesta mesura és la que està més correlacionada amb el risc cardiovascular i la reserva pancreàtica. (*Kohrt WM, 1993*) i (*Weidner MD, 1995*).

### *Circumferència del maluc*

Estant l'individu aixecat i amb roba interior, es determina la circumferència més àmplia a nivell dels glutis.

#### b) Mesura dels Plecs Cutanis

Es mesuren amb un lipocalibrador tipus Holtain®, (Cambridge, Regne Unit) el qual exerceix una pressió constant de 10g/mm<sup>2</sup>. S'ha utilitzat sempre el mateix aparell per a totes les mesures, amb una aproximació de 2 mm. Per tal d'evitar el biaix interobservador, totes les mesures les ha fet el mateix individu.

#### Mètode:

- Previ a l'acte de pessigar, cal localitzar el punt anatòmic exacte amb l'ajuda de la cinta mètrica.
- El plec es pren amb els dos dits separats aproximadament 8 centímetres. S'aixeca la pell 1 centímetre i es manté fins la mesura.
- Els braços del lipocalibrador es mantenen en posició horitzontal per tal d'evitar un biaix de la mesura. Es comprimeix la pell i es llegeix al cap de com a mínim dos segons d'haver començat a pessigar. S'agafa una fiabilitat en la lectura de 0.1 mm.
- En el còmput final s'agafa la mitjana de tres lectures consecutives.

#### *Plec bicipital:*

El subjecte d'empeus, relaxat i amb les mans mirant cap endavant, es pessiga en la línia mitja en la zona anterior del bíceps i un centímetre més alt que el plec del bíceps. La direcció del plec és vertical.

*Plec tricipital:*

El subjecte d'empeus, flexiona el braç 90° per poder localitzar el punt. Exten el braç i es pessiga en la línia mitja en la zona posterior en el punt mig entre l'acromi i l'olècran. La direcció del plec és vertical.

*Plec subescapular.*

El subjecte d'empeus amb els braços paral·lels al cos. Es pessiga en la zona immediatament inferior a l'angle de l'escàpula. El plec és oblic, formant 45° amb la línia horitzontal i seguint les línies dels plecs de la pell.

*Plec abdominal.*

El subjecte d'empeus amb els braços lleugerament separats. Es pessiga en la regió adjacent al melic en direcció vertical.

c) Àrea Muscular del Braç (AMB)

Aquest paràmetre és un índex de massa muscular (*Ricart W, 1993*). S'ajusta a l'equació:

$$AMB = CMB^2 / 4 \times 0.313$$

*CMB: Circumferència Muscular del Braç*

### **3.3.2.2. Impedància Bioelèctrica**

Aquesta tècnica aprofita el fet de què un corrent elèctric d'alta freqüència i de baix voltatge i intensitat es condueix de forma diferent segons el teixit. El corrent no travessa amb la mateixa facilitat el teixit gras, el muscular o un fluid com l'aigua cosa que es coneix com resistència bioelèctrica. Mitjançant un monitor de composició corporal Holtain BC Analyser es van determinar la massa grassa (kg) (FM), el percentatge de massa grassa (%) i la massa magra (kg) (FFM).

### **3.3.3. PARÀMETRES METABÒLICS**

Després d'un dejú de com a mínim 12 hores, a primera hora del matí es procedeix a l'extracció de mostres sanguínies mitjançant una única punció a la vena antecubital amb un sistema d'extracció al buit (Vacutainer®, Becton Dickinson, USA). Les mostres de sang venosa es van recollir i processar de forma diferent segons les determinacions a realitzar.

1.- Mostres de sèrum per a les determinacions dels paràmetres lipídics (colesterol total, VLDLc, LDLc i HDLc, triglicèrids, VLDL-triglicèrids), leptina i la forma glicosidada de la globulina transportadora de cortisol. Es centrifuguen a 3.000 g a 4°C i el sobrenedant es crioperserva en al.líquotes a - 70°C fins les determinacions corresponents.

De la mateixa forma es tracten les mostres per a les determinacions sèriques de glucosa i d'insulina durant els dos tests de tolerància a la glucosa. Les determinacions d'aquest dos paràmetres però, es realitzen de forma immediata a l'extracció del sobrenedant.

2.- Mostres de plasma per a les determinacions de sTNFRs, nivells d'IL-6 i globulina transportadora de cortisol, es van recollir en un tub amb EDTA com anticoagulant. Immediatament es centrifuguen a 3.000 g i a 4°C i del sobrenedant es fan al.líquotes i es conserven a - 70°C fins les determinacions. La resta es destina a l'extracció de DNA per les determinacions dels paràmetres genètics.



3.- Mostres de sang total per a la determinació de l'hemoglobina glicosidada, de la fórmula leucocitaria i del recompte de cèl.lules blanques.

### **3.3.3.1. Determinació de la Resistència a la Insulina**

#### a) Test de la Tolerància Oral a la Glucosa (OGTT)

El test es va practicar segons les recomanacions més recents del Comité Expert en el Diagnòstic i la Classificació de la Diabetis Mellitus (*Report of The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetis Mellitus, 1997*). Després de 12 hores en dejú l'individu ingereix una concentració de glucosa de 75g, moment que s'estableix com a temps 0. S'obtenen mostres sanguínies als 30 minuts, 60, 90 i 120 minuts per a determinar nivells sèrics de glucosa i d'insulina.

#### *Càlcul de l'àrea sota la corba de glucosa i d'insulina*

Es calculen per el mètode trapezoïdal a partir de les determinacions dels seus nivells de glucosa i insulina durant el test OGTT. En la representació gràfica es situen en abscisses els intervals de temps entre dues extraccions (30 minuts) i en ordenades els valors de la variable (glucosa o insulina). El mètode consisteix en sumar les àrees dels trapezoides formats pels intervals de temps entre dues extraccions consecutives, com a alçada del trapezoide, i els valors de la variable consecutius com a bases d'aquests.

#### b) Test de Tolerància Intravenosa a la Glucosa de mostreig freqüent (FSIVGTT)

Aquest test requereix 72 h. d'abstinència de cafeïna i alcohol, i tres dies sense practicar exercici físic amb una dieta de com a mínim 300 g de carbohidrats / dia. S'extrauen mostres bassals als minuts -15 i -5, abans de començar el test. Al cap

d'un minut (temps zero) s'injecten 300 mg/kg de glucosa. Als 20 minuts s'injecten en forma de bolo, 0.03 U/kg d'insulina el qual es seguit durant 3 hores de freqüents mostreigs de les concentracions circulants de glucosa i insulina a temps 0 fins a 180 minuts.

#### *Tècnica del model mínim*

Al patró de concentracions es van aplicar models matemàtics d'acord amb el programa informàtic MINMOL (*Bergman RN, 1987*) per al càlcul aproximat de l'índex de sensibilitat a la insulina ( $S_I$  o eliminació de la glucosa mediada per la insulina) i l'efectivitat de la glucosa ( $S_G$  o capacitat de la cèl·lula per a estimular la seva pròpia captació per les cèl·lules). L'índex per sota de  $2 \times 10^{-4}$  uU/ml x min. indica severa resistència a la insulina, mentre que valors de  $5 \times 10^{-4}$  uU/ml x min. s'observen en subjectes normals.

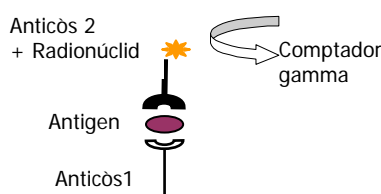
#### **3.3.3.2. Determinació de Glucosa**

Els nivells de glucosa sèrica durant els dos tests de tolerància a la glucosa es van determinar per el mètode enzim – colorimètric de la glucosa oxidasa en un Analitzador Beckman Synchron CX9 Clinical System ALX. El coeficient de variació va ser de 1.9 %.

#### **3.3.3.3. Determinació d'Insulina**

Els nivells d'insulina sèrica durant els dos tests de tolerància a la glucosa es van determinar mitjançant un assaig immunoradiomètric, seguint les recomanacions del Kit (IRMA; Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgica). Es tracta d'una tècnica no competitiva on la mostra amb l'antigen que es vol determinar s'incuba amb un anticòs fixat a la paret del tub. S'afegeix un segon anticòs marcat amb un radinucli (traçador) per tal de formar un “sandwich” on, la quantitat de traçador retingut augmenta així com augmenta la quantitat d'antigen. El traçador utilitzat va ser  $I^{125}$ .

El complex radioactiu es va comptar en un comptador gamma. El límit de detecció més baix va ser 4.0 mU/l. Els coeficient de variació intra-assaig va ser de 5.2% a una concentració de 10 mU/l i 3.4% a 130 mU/l, i els inter-assaig van ser 6.9% i 4.5% a 14 i 89 mU/l, respectivament.



Principi de l'IRMA.

#### **3.3.3.4. Determinació del Colesterol Total**

El colesterol sèric total i el de totes les fraccions es va determinar en un analitzador Beckman Synchron CX9 Clinical System ALX per la tècnica enzim-colorimètrica a punt final que es basa en la reacció de la colesterol esterasa, colesterol oxidasa i peroxidasa.

#### **3.3.3.5. Determinació de les Lipoproteïnes VLDLc, LDL-c i HDLc**

Les VLDL colesterol es van obtenir per el mètode d'ultracentrifugació convencional a 45.000g. Les HDLc es van precipitar amb una solució salina de polietilenglicol 6000 (PEG 6000). El subfraccionament en HDL<sub>2</sub> i HDL<sub>3</sub> va ser mitjançant la precipitació a concentracions diferents de polietilenglicol (*Kostner GM, 1985*).

Les LDLc es van calcular per la fórmula:

$$\text{LDLc} = \text{Colesterol Total} - (\text{VLDLc} + \text{HDLc})$$

### **3.3.3.6. Determinació de Triglicèrids i VLDL – Triglicèrids**

Els triglicèrids totals i els de la fracció de les VLDL es van determinar en un analitzador Beckman Synchron CX9 Clinical System ALX per el mètode enzim-colorimètric de la reacció de la glicerolfosfat-oxidasa i peroxidasa (*Wahlefeld AW, 1974*).

Els VLDL-triglicèrids es van mesurar després de ser aïllats amb una ultracentrifugació a 45.000 g.

### **3.3.3.7. Determinació d'Àcids Grassos Lliures (FFA)**

Es van determinar enzimàticament, amb àcid olèic com a estandar (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France).

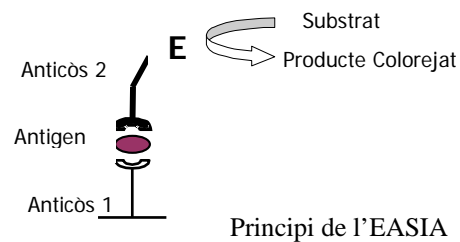
### **3.3.3.8. Determinació de Nivells de l'Hemoglobina glicosidada (HbA1c)**

L'hemoglobina glicosilada (HbA1) es va determinar per cromatografia d'alta resolució en un cromatògraf Hi-Auto A1c Analyzer®, model HA-8121 (Kyoto Daiichi, Japó). La fracció HbA1 indica les concentracions mitjanes de glucosa durant el cicle vital dels eritròcits. Els coeficients de variació van ser < 4%.

### **3.3.3.9. Determinació de les Fraccions Solubles dels Receptors 1 i 2 (sTNFR1, sTNFR2) del TNF $\alpha$ i dels Nivells d'IL-6**

En qualsevol dels casos es van determinar per enzimimmunoassaig de sensibilitat amplificada, tècnica “sandwich” seguint les recomanacions del proveïdor del Kit (EASIA, BioSource Europe, Fleunes, Belgica). El mètode es basa en un sistema oligoclonal en el qual s'usa una placa de microtitulació recoberta

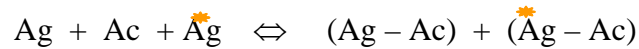
d'un conjunt d'anticossos monoclonals dirigits contra diferents epítops del antigen, i un segon anticòs monoclonal unit a un enzim que catalitza una reacció de coloració. La quantitat de producte es medeix per un canvi de color en un lector de plaques de microtitulació, i és directament proporcional a la quantitat d'antigen. En les determinacions de les sTNFRs, en els dos casos la concentració mínima detectable és de 0.1 ng/ml. Els coeficients de variació intra-inter assaig són  $< 7$  i  $< 9\%$  respectivament. El  $TNF\alpha$  no interfereix en l'assaig i no existeixen reaccions creuades entre sTNFR1 i sTNFR2. En el cas de la IL-6, la concentració mínima detectable és de 2 pg/ml, els coeficients de variació intra-inter assaig són  $< 6$  i  $< 8\%$  respectivament. Les fraccions solubles de la IL-6 i les del gp130 no interfereixen en l'assaig.



### 3.3.3.10. Determinació de Leptina

Es va determinar per radioimmunoassaig (RIA) seguint les recomanacions del Kit (Linco Research, Inc. Missouri, USA). El RIA és una tècnica analítica competitiva ja que està basada en el comportament competitiu de l'antigen i el traçador radioactiu (antigen marcat) per unir-se al mateix anticòs, de forma que en absència d'antigen tot el complex que es forma és radioactiu, i en augmentar la quantitat d'antigen, aquest desplaça al traçador del complex i es forma menys complex radioactiu. El complex es separa de la resta de la mostra i es compta la radioactivitat. El traçador radioactiu utilitzat va ser  $I^{125}$ -Leptina humana. El complex radioactiu es precipita amb polietilenglicol i es compta en un comptador de radiacions gamma. El límit més baix de detecció és de 0.5 ng/ml. Els coeficients

intra-inter assaig són  $< 7$  i  $< 8\%$  respectivament. No presentava reacció creuada amb la proinsulina, insulina o amb el glucagó.



Principi del Radioimmunoassaig. Sistema d'equilibri Antigen, Anticòs i Traçador.

Ag: Antigen, Ac: Anticòs, i  $\overset{*}{\text{Ag}}$ : Traçador.

### **3.3.3.11. Determinació de Globulina Transportadora de Cortisol (CBG) i la seva forma Glicosidada**

La globulina transportadora de cortisol es va determinar segons el radiimmunoassaig desenvolupat per Pugeat (*Pugeat M, 1989*).

Per la determinació de la forma glicosidada, mostres de sèrum van ser sotmeses a una absorció de sefarosa ConA.

### **3.3.3.12. Fórmula Leucocitària i Recompte de Cèl·lules Blanques**

Es van determinar per els tests de rutina del laboratori mitjançant un Coulter Electronics (ABBOTT Diagnostic Division, Illinois, USA).

## **3.3.4. PARÀMETRES GENÈTICS**

### **3.3.4.1. Extracció de l'Àcid Desoxirribonucèid (DNA)**

Per a l'extracció del DNA de les cèl·lules blanques es va utilitzar el Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen, Alemanya) seguint les recomanacions del proveïdor. El producte final resultant és DNA genòmic. El rendiment d'aquesta tècnica és de 100-500 ng/ $\mu\text{l}$ .

a) Quantificació i puresa del DNA.

*Fonament:*

Els nucleòtids en solució absorbeixen a la regió de l'espectre de la llum ultraviolada (UV) amb un màxim d'absorció al voltant de una longitud d'ona de 260nm. Les proteïnes també ho fan a UV però més a 280nm que a 260nm.

Els àcids nucleics van ser quantificats i estimada la seva puresa per espectrofotometria, mesurant la seva absorció a 260 i a 280nm i comparant els resultats amb els obtinguts en una solució pura, on la relació entre  $A_{260}$  i  $A_{280}$  que ens dona la puresa de la mostra ha de ser de 1,8.

Per a calcular la concentració de DNA es parteix de la base de que una solució amb una absorbància de 1 conté aproximadament 50 µg de DNA per ml.

$$\begin{array}{l} \text{Índex de puresa: } A_{260} / A_{280} \\ \text{Concentració DNA } \mu\text{g/ml} = A_{260} \times 50 \end{array}$$

Un cop quantificat es conserva a 4°C o congelat a -20°C.

**3.3.4.2. Anàlisi de la Regió 3' no Traduïda del Gen del TNFR2**

La zona a estudiar comprén del nucleòtid 501 al 692 (NCBI. GenBank, número d'accés:U52165) dins de la regió 3' no traduïda del gen.

L'anàlisi d'aquesta regió es va fer utilitzant la tècnica d'anàlisi de conformació de cadena única o SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms).

*Fonament:*

Desenvolupada al 1989 (*Orita M, 1989*) és un dels mètodes de rastreig de mutacions més utilitzats. El principi es basa en aplicar una electroforesi a un fragment de DNA amplificat i desnaturalitzat, en un gel no desnaturalitzant. Fer córrer una única cadena de DNA per aquests tipus de gels permet interaccions intramoleculares. Ja que el DNA no migra com una cadena lineal en el gel de SSCP, la mobilitat del DNA està influïda tant per la mida del fragment com per l'estructura terciària (conformació) que ha adoptat. La conformació del fragment

de cadena única depèn de la seva seqüència nucleotídica. Si existeix una mutació, la conformació és alterada, la mobilitat del fragment en el gel també.

*Procediment:*

1.- Amplificació mitjançant la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) del fragment de la regió 3' UTR que volem analitzar.

La PCR és una tècnica per a l'amplificació selectiva "in vitro" (d'una magnitud de  $10^6$  còpies) de seqüències específiques de DNA limitades pels oligonucleòtids cebadors. El mètode de la PCR va ser elaborat per Mullis al 1987 (*Mullis K, 1987*).

Es van dur a terme en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE ABI, Foster City, USA).

Els cebadors que es van utilitzar van ser (NCBI.Genbank, nombre d'accés: U52165):

Seqüència cebador amb sentit: 5' AGG ACT CTG AGG CTC TT CT 3'

Seqüència cebador antisentit: 5' TCA CAG AGA GTC AGG GAC TT 3'

El volum final de reacció va ser de 50  $\mu$ l i contenia: 100 ng de DNA mostra, 1.2 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8.4, 0.2 mM de cada dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Germany), 1 unitat de Taq DNA polimerasa (GibcoBRL, Carsbad, USA), i 0.2  $\mu$ M de cada cebador (GibcoBRL, Carsbad, USA).

El DNA es va amplificar durant 35 cicles amb una desnaturalització a 94°C durant 30 segons, acoplament de cebadors a 66°C durant 30 segons i extensió a 72°C, 30 segons. Finalment es sotmet a una extensió a 72°C durant 7 minuts.

La mida del fragment amplificat és de 191 parells de bases (pb.).

2.- Visualització del fragment amplificat en un gel d'agarosa.

L'obtenció de gels d'agarosa es realitza a base de fondre la quantitat d'agarosa desitjada (en funció de la concentració final del gel) en un tampó adequat, i fusió de la mescla fins obtenir una solució clara i homogènia. Es deixa refredar i s'afegeix el colorant bromur d'etidi que s'intercala entre les bases dels



nucleòtids del DNA i permet visualitzar-lo com a banda de color taronja sota la llum ultraviolada. L'agarosa fosa es tira en un motlle de metacrilat amb una pinta que formarà els pous on es dipositarà el DNA amplificat i es deixar solidificar. Per la visualització directa de la situació del DNA al gel, al producte amplificat incorporem el colorant blau de bromofenol.

Aquest tipus de gels es sotmeten a electroforesi horitzontals sota un camp elèctric de direcció constant.

La concentració del gel per a visualitzar la banda de la regió amplificada de 191 pb. va ser a 1%. Es va mesclar 1g. d'agarosa (Gibco BRL, Carsbad, USA )amb 50 ml del tampó TBE. L'electroforesi va ser a 100 V durant 15 minuts. La banda es va contrastar amb el marcador de mida coneguda Marker VIII (Roche Molecular Biochemicals, Alemanya).

### 3.- Desnaturalització del producte amplificat.

Per a la molècula del DNA la configuració nativa és una doble hèlix i parlem d'un estat desnaturalitzat quan passa a ser de cadena única.

A un volum de 2-4 µl de producte amplificat (segons el rendiment de la PCR) es va afegir 20 µl de la solució desnaturalitzant que contenia: 91% de formamida i 9% de blau de bromofenol i xilencianol. Per tal de desnaturalitzar les dobles cadenes de DNA, la mescla es calenta a 96°C durant 10 minuts.

### 4.- Electroforesi en gel no desnaturalitzant de poliacrilamida (PAGE).

El poder de resolució dels gels de poliacrilamida és extremadament alt. S'utilitzen en una configuració vertical i a un voltatge constant. Els monòmers d'acrilamida es polimeritzen en cadenes llargues com a conseqüència d'una reacció que s'inicia en presència de radicals lliures, aportats per el persulfat amoni i estabilitzats per TEMED (GibcoBRL, Carsbad, USA). Quan s'incorpora la bisacrilamida, les cadenes s'uneixen i determinen la porositat del gel.

La concentració del gel d'acrilamida va ser al 12% (acrilamida/bisacrilamida (GibcoBRL, Carsbad, USA) en proporció 30:1). L'electroforesi va ser a 120 V durant 17 hores i a temperatura ambient.

5.- Revelat del gel.

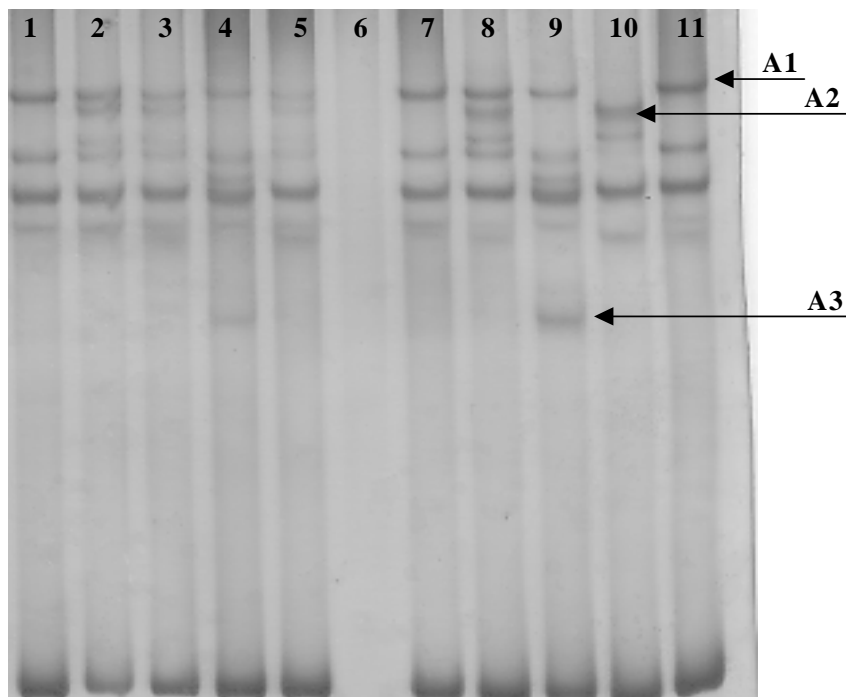
El revelat del gel va ser amb tinció de plata. Es va utilitzar: àcid nítric 1% (Merck, U.S.A), solució de plata al 0.2% (Merck, U.S.A), solució de carbonat sòdic (formaldehid 37% i carbonat sòdic 0.28M (Merck, U.S.A)), àcid acètic 10% (Merck, U.S.A) i glicerol 10% (Merck, U.S.A) per aquest ordre citat.

Els anàlisis de SSCP van mostrar 3 patrons de bandes diferents, tal com mostra la figura 9.

6.- Seqüenciació automàtica en capil·lar dels patrons de bandes.

La seqüenciació automàtica consisteix en una PCR cíclica, on els dideoxinucleòtids estan marcats amb quatre fluorocroms de diferent color, i en una electroforesi en gels en fins capil·lars per on es separen els fragments segons la seva longitud. El nucleòtid queda determinat quan el fluorocrom es excita per un làser al final de l'electroforesi. L'anàlisi de les senyals rebudes a l'ordinador permet establir la seqüència del fragment a estudi.

**Figura 9:** Patró de bandes que caracteritza a les variants A1, A2 i A3 en la regió 3'UTR del gen del TNFR2. Gel acrilamida-bisacrilamida 30:1 al 12%.



Per tal de caracteritzar les variants, es va extraure el DNA de les bandes que formaven els patrons variables al gel amb el Kit QUIAEX II Gel extraction Kit (Quiagen, Alemanya) seguint les recomanacions del proveïdor. El DNA es va seqüenciar amb el Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (ABI, Foster City, USA) i amb un seqüenciador model DRA 373A (ABI, Foster City, USA) seguint les recomanacions del proveïdor.

La seqüenciació automàtica va revelar 3 variants genètiques, A1, A2 i A3, amb mutacions puntuals als nucleòtids 593, 598 i 620 que es corresponien amb els 3 patrons de bandes anòmals al gel. A més a més, amb la seqüenciació es va determinar una nova variant A4. (taula 4)

**Taula 4:** Variants genètiques de la regió 3'UTR del gen del TNFR2 ( 593A>G; 598T>G; 620T>C), determinades per SSCP (A1,A2 i A3) i per seqüenciació automàtica (A4).

VARIANTS	Nucleòtid 593	Nucleòtid 598	Nucleòtid 620
A1	<b>G</b>	T	T
A2	A	T	<b>C</b>
A3	A	<b>G</b>	T
A4	A	T	T

### 3.3.4.3. Anàlisi del Polimorfisme Genètic –174 G>C del Gen de la IL-6

Es tracta d'una transversió G>C a la posició – 174, dins del promotor del gen de la IL-6. Aquest canvi produeix un polimorfisme del tipus de fragments de restricció de longitud polimòrfica i es va estudiar per el mètode d'anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP).

*Fonament:*

Els enzims de restricció es purifiquen d'una gran varietat de bacteries. S'uneixen específicament al DNA de doble cadena i el fraccionen (digestió del DNA) per llocs específics o zones adjacents a una seqüència particular denominada diana de restricció. Els fragments de diferent longitud resultants es poden analitzar per electroforesi.

Ocasionalment les mutacions creen o destrueixen dianes de restricció al DNA cosa que permet detectar-les per enzims de restricció.

*Procediment:*

1- Amplificació mitjançant la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) del fragment del gen de la IL-6 que conté el polimorfisme.

Els oligonucleòtids cebadors van ser (Genbank, nombre d'accés: AF048692):

Seqüència cebador amb sentit: 5' TGA CTT CAG CTT TAC TCT TTG T 3'

Seqüència cebador antisentit: 5' CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG 3'

El volum final de reacció va ser de 50 µl i contenia: 100 ng de DNA mostra, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8.4, 0.2 mM de cada dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Alemanya), 2 unitats de Taq DNA polimerasa (GibcoBRL, Carsbad, USA), i 0.2 µM de cada oligonucleotid cebador (GibcoBRL, Carsbad, USA).

El DNA es va amplificar durant 30 cicles amb una desnaturalització a 94°C durant 30 segons, acoplament de cebadors a 55°C durant 30 segons i extensió a 72°C, 30 segons. Finalment es sotmet a una extensió de 72°C, 7 minuts. La mida del fragment amplificat és de 198 parells de bases.

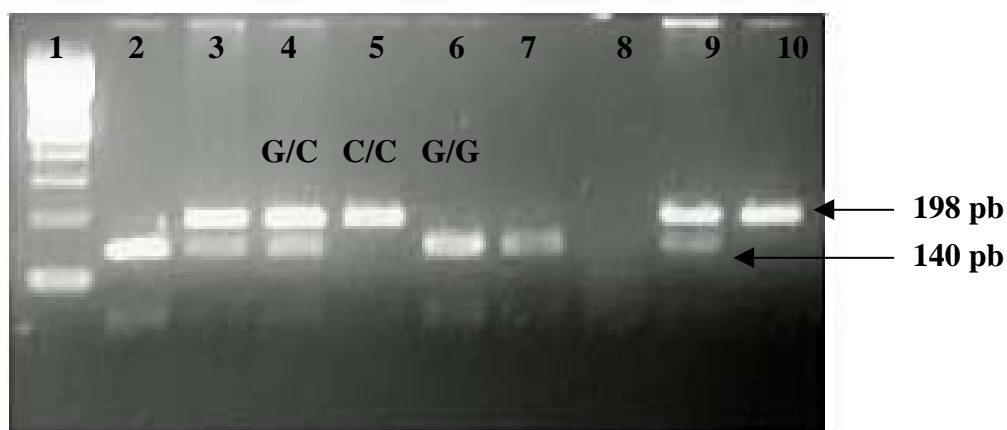
2- Visualització del fragment amplificat en un gel d'agarosa al 2% tenyit amb bromur d'etidi. Electroforesi a 60 V durant 15- 20 minuts. Marcador de mida coneguda Marker VIII (Roche Molecular Biochemicals, Alemanya).

3- Digestió del fragment amplificat amb l'enzim de restricció Sfa N I (New England BioLabs, Beverly, USA) segons les condicions recomanades per el proveïdor.

4- Visualització dels fragments de digestió en un gel d'agarosa d'alta resolució (permet una millor resolució de les bandes) al 2,5% i per tinció amb bromur d'etidi. Electroforesi a 60 V durant 20 minuts.

Es va detectar un polimorfisme dial·lèlic, on la presència de la banda de 198 pb. correspon a l'al·lel A1 o C (absència de diana de restricció) i la de les bandes de 140 i 58 pb. a l'al·lel A2 o G (presència de la diana de restricció). Les bandes es van contrastar amb el marcador de mida coneguda Marker VIII (figura 10).

**Figura 10:** Polimorfisme -174G>C del gen de la IL-6. Gel d'agarosa al 2,5%  
1: Marcador de mida molecular, 2-10: Mostres



### **3.4. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES.**

L'anàlisi estadístic es va realitzar utilitzant dels paquets estadístic BMDP (BioMedical Package) i SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) (versió 6.0).

#### **PROVES ESTADÍSTIQUES REALITZADES.**

- Proves d'ajust a la corba de Gauss de totes les variables: prova de Shapiro-Wilks. Les variables que no es distribueixen de forma Gausiana, es transformen logarítmicament per tal d'adquirir la normalitat.
- Estadística descriptiva. Mitjana i Desviació estàndar per a les variables quantitatives.
- Prova "t" d'Student-Fisher (prèvia comprovació de la homogeneïtat de les variàncies mitjançant la prova "F" de Fisher-Snedecor) per la comparació de mitjanes de variables quantitatives amb dos categories.
- Prova de Ji-quadrat amb la correcció de Yates (quan va ser necessari) o prova exacta de Fisher, per a la comparació de variables qualitatives.
- Anàlisi unidireccional de la variància (comprovant primer l'homogeneïtat de les variàncies mitjançant la prova "F" de Fisher-Snedecor), per a l'estudi de comparacions de mitjanes de dos variables quantitatives amb més de dos categories.
- Anàlisi de correlació. Coeficients de correlació de Pearson.
- Regressió lineal múltiple per a variables dependents quantitatives i independents qualitatives o quantitatives. Mètode Stepwise. El coeficient de regressió generat per aquest anàlisi indica la pendent de l'associació entre la variable dependent i la independent especificada, després d'ajustar per altres variables independents del model.

El model  $R^2$  representa el percentatge de variació de la variable dependent que s'explica per les variables independents incloses en el model.

- Anàlisi de regressió logística. Per a l'estudi de variables dependents qualitatives on participen varies variables independents.
- Càlcul de les freqüències gèniques i al·lèliques de les poblacions. Acceptant el model d'herència mendeliana dels RFLP's la combinació dels al·lèls que pertanyen a un locus es regeix per la llei d'equilibri de poblacions o llei de Hardy-Weinberg (*Hardy GH, 1908*). Aquesta llei estableix que, en absència de factors externs, la freqüència dels al·lèls ha de ser constant a través de les generacions. Així, la població en estudi es divideix en dos grups: aquells individus que presenten el marcador considerat (freqüència = p) i els que no el presenten (freqüència = (1-p) o q. De la combinació al·leatòria de dos al·lèls, A i a (no A), amb freqüències al·lèliques p i q respectivament, i en les condicions d'equilibri poblacional, resultarien 3 genotips AA, aa i Aa de freqüències  $p^2$ ,  $q^2$  i  $2pq$  respectivament. Es compleix que  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ .

## **4. PUBLICACIONS**



**ESTUDI 1.**

**PLASMA LEVELS OF THE SOLUBLE FRACTION OF TUMOR NECROSIS  
FACTOR RECEPTOR 2 AND INSULIN RESISTANCE. Diabetes 47:1757-62, 1998.**

# Plasma Levels of the Soluble Fraction of Tumor Necrosis Factor Receptor 2 and Insulin Resistance

José-Manuel Fernández-Real, Montserrat Broch, Wifredo Ricart, Roser Casamitjana, Cristina Gutierrez, Joan Vendrell, and Cristobal Richart

Recent studies have shown that the tumor necrosis factor (TNF) system is implicated in the insulin resistance of human obesity. Plasma concentrations of the soluble fraction of the TNF receptors 1 and 2 (sTNFR1 and sTNFR2) are thought to reflect the degree of activation of the TNF system. The purpose of this study was to explore whether this activation, as measured by the levels of circulating sTNFR1 and sTNFR2, is associated with insulin resistance. A total of 19 men (mean age  $36.2 \pm 1.9$ ; BMI  $28.8 \pm 1.2$ , range 22.2–35.7) and 17 premenopausal women (age  $34.9 \pm 1.4$ ; BMI  $28.1 \pm 0.8$ , range 19–37.9) were studied. Men showed higher levels of plasma sTNFR1 and sTNFR2 than women. However, obese men showed increased levels of sTNFR2 but similar levels of sTNFR1 in comparison with obese women. In fact, sTNFR2 levels correlated with BMI ( $r = 0.50$ ,  $P = 0.002$ ), fat-free mass (FFM) ( $r = 0.61$ ,  $P < 0.0001$ ), and waist-to-hip ratio (WHR) ( $r = 0.39$ ,  $P = 0.02$ ), but not with fat mass or percent fat mass. sTNFR2 levels correlated with basal glucose levels ( $r = 0.45$ ,  $P = 0.007$ ), area under the curve (AUC) for glucose during an oral glucose tolerance test ( $r = 0.42$ ,  $P = 0.013$ ), and with the quotient AUC glucose/log AUC insulin ( $r = 0.41$ ,  $P = 0.015$ ). sTNFR2 also correlated negatively with insulin sensitivity ( $S_I$ ), evaluated using the frequently sampled intravenous glucose tolerance test with minimal model analysis ( $r = -0.38$ ,  $P = 0.02$ ). Plasma sTNFR1 levels were not associated with any of these variables. Because WHR influenced both  $S_I$  and sTNFR2 levels, we constructed a multiple linear regression to predict  $S_I$  with WHR and sTNFR2 as independent variables. In this model, both WHR ( $P = 0.0078$ ) and sTNFR2 levels ( $P = 0.025$ ) contributed to 47% of the variance in  $S_I$ . In parallel with higher FFM, lean and obese men showed a lower  $S_I$  ( $2.9 \pm 0.9$  vs.  $5.2 \pm 1.3 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mU} \cdot \text{l}^{-1}$ ,

$P = 0.001$ ; and  $1.15 \pm 1.1$  vs.  $1.8 \pm 0.8 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mU} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $P = 0.035$ , respectively) and higher sTNFR2 levels in comparison with lean and obese women, respectively. After controlling for FFM, the correlation between  $S_I$  and sTNFR2 levels disappeared, indicating that FFM was significantly influencing these associations. In summary, plasma sTNFR2 levels, but not sTNFR1, were proportional to BMI, WHR, FFM (a well-known confounder in the evaluation of insulin sensitivity), basal and postload glucose levels, and insulin resistance. These findings support TNF- $\alpha$  as a system regulating insulin action in human obesity. *Diabetes* 47:1757–1762, 1998

In the last years, it has been demonstrated that tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  has important effects on whole-body lipid and glucose metabolism (1,2). Fat tissue is a significant source of endogenous TNF- $\alpha$  production, and the expression of this cytokine is elevated in human obesity in both adipose (3,4) and muscle (5) tissues. TNF- $\alpha$  actions in obesity appear to occur via an autocrine-paracrine mechanism in these latter tissues (4,5). Neither the mechanisms that control this restricted activity nor the receptor systems that are involved in TNF- $\alpha$  signaling are clearly understood (6,7). TNF signals through at least two known cell-surface receptors (6,7) (TNFRs), TNFR1 (p60) and TNFR2 (p80), that are present in virtually all cells of higher mammals, including adipocytes. It appears that TNFR1 can signal for virtually all known activities of TNF, including apoptosis, differentiation, and proliferation. TNFR2 seems to signal metabolic actions (8,9).

Cytokines circulate bound to a number of binding proteins that appear to alter their clearance rates and/or enhance their biological activity. Both TNFRs exist also in soluble forms (10–13), apparently derived by proteolytic cleavage from the cell-surface forms (14). These soluble TNFRs (sTNFRs) can compete with the cell-surface receptors and thus block TNF activity, safeguarding against its potentially harmful effects. However, sTNFRs affect TNF function also by stabilizing its activity (15), most likely by preventing dissociation of the homotrimeric TNF molecules (16) to inactive monomers. It has been suggested that sTNFR1 and sTNFR2 represent a buffer system that prolongs the biologic effects of TNF- $\alpha$  by forming a “slow release reservoir” and impeding spontaneous denaturation of the cytokine (15).

Limited information is currently available concerning the effects of the two TNFRs in energy metabolism and glucose homeostasis. In a recent study, obese women expressed approximately twofold more TNFR2 mRNA in fat tissue and approximately sixfold more sTNFR2 in circulation relative

From the Department of Endocrinology (J.M.F.-R., W.R.), University Hospital of Girona “Dr. Josep Trueta,” Girona; the Department of Endocrinology (M.B., C.G., J.V., C.R.), University Hospital of Tarragona Joan XXIII, Tarragona; and the Hormonal Laboratory (R.C.), University Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

Address correspondence and reprint requests to J.M. Fernández-Real, MD, Department of Endocrinology, Hospital de Girona, Ctra. França s/n, 17007 Girona, Spain. E-mail: hosprueta@comgir.com.

Received for publication 27 March 1998 and accepted in revised form 8 July 1998.

ASF, abdominal skinfold thickness; AUC, area under the curve; BSF, biceps skinfold thickness; CV, coefficient of variation; FFM, fat-free mass; FSI GTT, frequently sampled intravenous glucose tolerance test; IGT, impaired glucose tolerance; MAMA, mid-arm muscle area; MAMC, mid-arm muscle circumference; NGT, normal glucose tolerance; OGTT, oral glucose tolerance test;  $S_G$ , glucose effectiveness;  $S_I$ , insulin sensitivity index; SSF, subscapular skinfold thickness; sTNFR, soluble tumor necrosis factor receptor; TNF, tumor necrosis factor; TNFR, tumor necrosis factor receptor; TSF, triceps skinfold thickness; WHR, waist-to-hip ratio.

sTNFR2 AND INSULIN RESISTANCE

to lean control subjects (8). Adipose tissue expression of TNFR2 strongly correlated with BMI and the level of insulinemia. In contrast, no correlation was observed between any of the metabolic variables that were measured (glucose, insulin, lipids, BMI) and TNFR1 expression (8). More specifically, TNFR1 expression and protein levels were similar in lean and obese subjects. sTNFR1 levels correlated with leptin levels independently of BMI in another study (17). In these latter studies, the relationships among sTNFR1, sTNFR2, and glucose or insulin resistance were inferred from isolated plasma levels of glucose and insulin.

TNF- $\alpha$  is a strong candidate for abnormalities in glucose metabolism, but circulating TNF- $\alpha$  levels are usually not informative. This is probably due to difficulties in measuring TNF in plasma, where it normally is in a very low concentration, in the range of picograms per milliliter. Compared with circulating TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 levels remain elevated for longer periods of time and are of more value for monitoring inflammatory responses (15). Furthermore, sTNFRs are significantly elevated in plasma, are very stable proteins, and are quite easy to measure.

The purpose of this study was to explore whether activation of the TNF- $\alpha$  system, measured through the levels of circulating sTNFR1 and sTNFR2, is associated with insulin resistance.

#### RESEARCH DESIGN AND METHODS

**Subjects.** We studied 36 subjects: 19 men (mean age  $36.2 \pm 1.9$ ; BMI  $28.8 \pm 1.2$ , range 22.2–35.7) and 17 premenopausal women (mean age  $34.9 \pm 1.4$ ; BMI  $28.1 \pm 0.8$ , range 19–37.9). Characteristics of the subjects are summarized in Table 1. Inclusion criteria for the subjects were 1) a BMI (weight in kilograms divided by the square of height in meters)  $>30$  and  $<40$  kg/m<sup>2</sup> for obese and  $<27$  (for men) or  $<25$  kg/m<sup>2</sup> (for women) for lean subjects, 2) the absence of any systemic disease, and 3) the absence of any infections. None of the subjects were taking any medication or had any evidence of metabolic disease other than obesity, and all reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study. All subjects were normotensive and normolipemic (data not shown). Because the BMI only provides a crude measurement of body fatness, some men and women with BMI values  $<25$  kg/m<sup>2</sup> had relatively higher levels of body fat, as assessed by bioelectric impedance, and thus the two subgroups considerably overlapped for body fatness indexes. Metabolic and hormonal data on some of the subjects were reported in two previous publications (18,19). The protocol was approved by the hospital ethics committee, and informed consent was obtained from each subject.

**Anthropometric measurement.** All subjects were evaluated, in addition to BMI, through the following anthropometric parameters: triceps skinfold thickness (TSF), biceps skinfold thickness (BSF), subscapular skinfold thickness (SSF), abdominal skinfold thickness (ASF), mid-arm muscle circumference (MAMC), and mid-arm muscle area (MAMA). TSF, BSF, SSF, and ASF were measured with a skinfold caliper (Holtain, Cambridge, U.K.). MAMC and MAMA were calculated as previously described (20). Values for each variable were expressed as a percentage of the 50th percentile adjusted by sex and age as obtained from a large sample of a healthy population living in the same area covered by our hospital (20). The percentage of body fat and fat-free mass (FFM) were measured by bioelectric impedance analysis (Holtain BC Analyser).

**Study protocol.** An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed according to the recommendations of the National Diabetes Data Group (21). After a 12-h overnight fast, glucose was ingested in a dose of 75 g, and blood samples were collected through a venous catheter from an antecubital vein at 0, 30, 60, 90, and 120 min for measurement of serum glucose and insulin. The glucose and insulin total areas under the curve (AUCs) during the OGTT were determined by the trapezoidal method.

For the frequently sampled intravenous glucose tolerance test (FSIGTT), subjects consumed a weight-maintaining diet containing at least 300 g of carbohydrate per day and refrained from exertion for 3 days before the test. The subjects also abstained from caffeine and alcohol for 72 h before the tests. All women had regular menstrual cycles. FSIGTT and OGTT were performed on days 3–8 of two consecutive menstrual cycles. The experimental protocol started between 8:00 and 8:30 A.M. after an overnight fast. A butterfly needle was inserted into an antecubital vein, and patency was maintained with a slow saline drip.

Basal blood samples were drawn at  $-15$  and  $-5$  min, after which glucose (300 mg/kg body wt) was injected over 1 min starting at time 0. At 20 min, regular insulin

(0.03 U/kg) was injected as a bolus. Additional samples were obtained from a contralateral antecubital vein at times 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, and 180 min. Samples were rapidly collected via a three-way stopcock connected to the butterfly needle.

**Analytical methods.** The serum glucose level during the FSIGTT was measured in duplicate by the glucose oxidase method with a Beckman Glucose Analyzer 2 (Brea, CA). The coefficient of variation (CV) was 1.9%. The serum insulin level during the FSIGTT was measured in duplicate by monoclonal immunoradiometric assay (IRMA; Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). The lowest limit of detection was 4.0 mU/L. The intra-assay CV was 5.2% at a concentration of 10 mU/L and 3.4% at 130 mU/L. The interassay CVs were 6.9 and 4.5% at 14 and 89 mU/L, respectively.

The Medgenix sTNF-R1 EASIA and sTNF-R2 EASIA (BioSource Europe, Fleunes, Belgium) are solid-phase enzyme-amplified sensitivity immunoassays performed on microtiter plate. The minimum detectable concentration was estimated to be 0.1 ng/ml and was defined as the sTNFR1 or sTNFR2 concentration corresponding to the average of 20 replicates of the zero standard + 2 SDs. The intra-assay and interassay CVs were  $<7$  and  $<9\%$ . sTNFR1 EASIA does not cross-react with sTNF-R2. TNF- $\alpha$  does not interfere with the assay.

**Data analysis.** Data from the FSIGTT were submitted to computer programs that calculate the characteristic metabolic parameters by fitting glucose and insulin to the minimal model that describes the time course of glucose and insulin concentrations. The glucose disappearance model, by accounting for the effect of insulin and glucose on glucose disappearance, provides the parameters  $S_1$  ( $10^{-4}$  per minute per microunit per milliliter) or the insulin sensitivity index, a measure of the effect of insulin concentrations above the basal level to enhance glucose disappearance, and  $S_G$  (per minute) or glucose effectiveness, defined as the effect of glucose itself, at basal insulin, to promote its own disposal through uptake by mass action into the tissues and through suppression of endogenous glucose production. The estimation of model parameters was performed according to the MINMOD computer program (22).

**Statistical analyses.** Descriptive results of continuous variables are expressed as means  $\pm$  SD. Non-Gaussian-distributed variables were  $\log_{10}$  transformed to achieve normality. This applied to insulin sensitivity and sTNFR2. Relationships between variables were sought by Pearson's correlation coefficient and stepwise multivariate linear regression analysis with forward selection. The regression coefficient generated by this analysis indicates the slope of the association between the dependent variable and the specified independent variable, after adjusting for other independent variables in the model. The SE represents the variability in this association, and the significance is reflected by the  $P$  value. The model  $R^2$  indicates the percent of the variance in the dependent variable that is accounted for by the independent variables included in the model. Comparison of variables across lean and obese men and women was performed by one-way analysis of variance using Fisher's test for multiple comparisons. Levels of statistical significance were set at  $P < 0.05$ . All these analyses were performed with the BMDP statistical package (BMDP Statistical Software, Cork, Ireland).

#### RESULTS

Tables 1 and 2 summarize the characteristics of the study subjects at the time of entry into the study. Among the 36 subjects, 4 men and 3 women (all obese) had impaired glucose tolerance (IGT), whereas 29 had normal glucose tolerance (NGT), as judged by the OGTT. No significant differences were found in sTNFR1 or sTNFR2 levels between obese subjects with NGT or IGT. Exclusion of these participants from the subsequent analyses resulted in little change, so they were retained in the analyses to increase statistical power.

**Influence of sex and body composition.** Overall, compared with women, men showed increased levels of plasma sTNFR1 ( $1.65 \pm 0.22$  vs.  $1.44 \pm 0.26$  ng/ml,  $P = 0.019$ ) and sTNFR2 ( $3.3 \pm 0.5$  vs.  $2.66 \pm 0.47$  ng/ml,  $P = 0.001$ ). Lean men showed increased levels of sTNFR1 and sTNFR2 in comparison with lean women (Table 2). Obese men showed increased levels of sTNFR2 but similar levels of sTNFR1 compared with obese women (Table 2).

Obese men and women showed levels of sTNFR1 similar to that of lean men and women, respectively (NS). In contrast, sTNFR2 was higher in obese men and women than in lean control men and women ( $P = 0.023$  and  $0.045$ , respectively). In fact, sTNFR2 correlated with BMI ( $r = 0.50$ ,  $P = 0.002$ ), FFM

TABLE 1  
 Anthropometric and clinical characteristics of the study subjects

Characteristics	Lean men	Lean women	Obese men	Obese women
n	9	7	10	10
Age (years)	34.5 $\pm$ 6	33.7 $\pm$ 6.3	38.5 $\pm$ 4.7	35 $\pm$ 8.1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.4 $\pm$ 1.7	19.8 $\pm$ 1.6	32.7 $\pm$ 2	32.3 $\pm$ 2.7
Waist (cm)	88 $\pm$ 4.6	77.7 $\pm$ 11.4	105.9 $\pm$ 7.8	107.1 $\pm$ 9.7
WHR	0.98 $\pm$ 0.04	0.85 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.01
Fat mass (kg)	13.28 $\pm$ 7.8	11.15 $\pm$ 3.2	30.56 $\pm$ 8.9	33.42 $\pm$ 6.2
Body fat (%)	17.51 $\pm$ 9.4	19.95 $\pm$ 3.7	30.16 $\pm$ 6.2	39.29 $\pm$ 5.6
FFM (kg)	61.94 $\pm$ 9.1	43.9 $\pm$ 4.7	69.9 $\pm$ 7.7	51.2 $\pm$ 4.8
TSF (%)	108.2 $\pm$ 35.5	90.2 $\pm$ 21.6	178.1 $\pm$ 68.3	153.2 $\pm$ 25.4
SSF (%)	112.3 $\pm$ 17	73.04 $\pm$ 21	219 $\pm$ 59.7	213.9 $\pm$ 20.9
ASF (%)	109.5 $\pm$ 28.8	71.2 $\pm$ 25	176.4 $\pm$ 35	172.1 $\pm$ 35.2
MAMC (%)	102.7 $\pm$ 6.4	100.19 $\pm$ 5.9	112.6 $\pm$ 10.3	119.9 $\pm$ 10
MAMA (%)	106.2 $\pm$ 13.4	100.6 $\pm$ 12.2	127.8 $\pm$ 23.5	144.7 $\pm$ 23.3

Data are means  $\pm$  SD.

( $r = 0.61$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 1), and WHR ( $r = 0.39$ ,  $P = 0.02$ ) but not with fat mass or percent fat mass. sTNFR2 also correlated positively with MAMC and MAMA (both  $r = 0.61$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 1), two indicators of the muscle compartment. In a multiple linear regression in a stepwise manner to predict sTNFR2, with FFM and sex as independent variables, only FFM predicted sTNFR2 ( $P = 0.04$ ), contributing to 39% of the variance in sTNFR2.

**Insulin sensitivity.** sTNFR2 levels correlated with basal glucose levels ( $r = 0.45$ ,  $P = 0.007$ ) and with AUC glucose during the OGTT ( $r = 0.42$ ,  $P = 0.013$ ). This latter relationship improved when subjects with IGT were excluded from the analyses ( $r = 0.75$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 2). An association was observed between sTNFR2 levels and the quotient AUC glucose/log AUC insulin ( $r = 0.41$ ,  $P = 0.015$ ). sTNFR2 also correlated negatively with  $S_1$  ( $r = -0.38$ ,  $P = 0.02$ ; Fig. 3). Because WHR influenced both  $S_1$  and sTNFR2 levels, we constructed a multiple linear regression to predict  $S_1$  with WHR and sTNFR2 as independent variables. In this model, both WHR ( $P = 0.0078$ ) and sTNFR2 ( $P = 0.025$ ) levels contributed to 47% of the variance in  $S_1$ .

In parallel with higher FFM, lean and obese men showed a lower  $S_1$  ( $P = 0.001$  and  $0.035$ , respectively) and higher sTNFR2 levels in comparison with lean and obese women, respectively (Table 2). After controlling for FFM, the correlation between  $S_1$  and sTNFR2 disappeared, indicating that FFM was significantly influencing these associations.

## DISCUSSION

TNF- $\alpha$  is a candidate mediator of insulin resistance in obesity: as it is overexpressed in the adipose and muscle tissues of rodents and humans and because it blocks the action of insulin in cultured cells and whole animals (3-5,23,24). Weight loss caused by dietary treatment of obesity results in a significant decrease in the amount of TNF- $\alpha$  expression in adipose and muscle tissues (3-5). The induction of insulin resistance is mediated through its ability to produce serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1, decreasing the tyrosine kinase activity of the insulin receptor (25). In a recent study, obese mice with a targeted null mutation in the gene encoding TNF- $\alpha$  were spared from obesity-induced deficiencies in insulin receptor signaling in fat and muscle tissues (26).

The correlation between basal and postload serum glucose levels and sTNFR2 may suggest that both glucose and sTNFR2 might be regulated by the same obesity-related signal. In fact, increased expression of TNF- $\alpha$  strongly correlates with the level of hyperinsulinemia (4) and the glucose disposal rate during the euglycemic clamp technique (5). Because TNF- $\alpha$  is a strong inducer of TNFR2 expression in adipocytes (8) and other cell types (27), the negative correlation between insulin sensitivity and sTNFR2 might be attributed to increased TNF- $\alpha$  action in situations of insulin resistance. Here we describe, for the first time, to our knowledge, a relationship between insulin action and plasma sTNFR2 concentration.

TABLE 2  
 Biochemical variables of the study subjects

	Lean men	Lean women	P value	Obese men	Obese women	P value
Fasting glucose (mmol/l)	5.31 $\pm$ 0.48	4.58 $\pm$ 0.33	NS	5.77 $\pm$ 0.53	5.43 $\pm$ 1.25	NS
Fasting insulin (mU/l)	8.27 $\pm$ 2.5	5.7 $\pm$ 1.5	NS	15.9 $\pm$ 8.8	12.1 $\pm$ 5.2	NS
Glucose AUC (mmol/l)	7.31 $\pm$ 0.6	5.95 $\pm$ 1.83	NS	10.6 $\pm$ 2.7	8.8 $\pm$ 3.6	NS
Insulin AUC (mU/l)	69.1 $\pm$ 27.9	49.3 $\pm$ 25.3	NS	114.1 $\pm$ 50	82.6 $\pm$ 51.4	NS
$S_1$ (min <sup>-1</sup> · mU · l <sup>-1</sup> )	2.98 $\pm$ 0.9	5.26 $\pm$ 1.36	0.001	1.15 $\pm$ 1.1	1.8 $\pm$ 0.8	0.035
sTNFR1 (ng/ml)	1.68 $\pm$ 0.12	1.38 $\pm$ 0.31	0.034	1.62 $\pm$ 0.28	1.48 $\pm$ 0.22	NS
sTNFR2 (ng/ml)	3.07 $\pm$ 0.45	2.38 $\pm$ 0.39	0.014	3.5 $\pm$ 0.5	2.79 $\pm$ 0.46	0.003

Data are means  $\pm$  SD.  $S_1$  was derived from the frequently sampled intravenous glucose tolerance test with minimal model analysis.

sTNFR2 AND INSULIN RESISTANCE

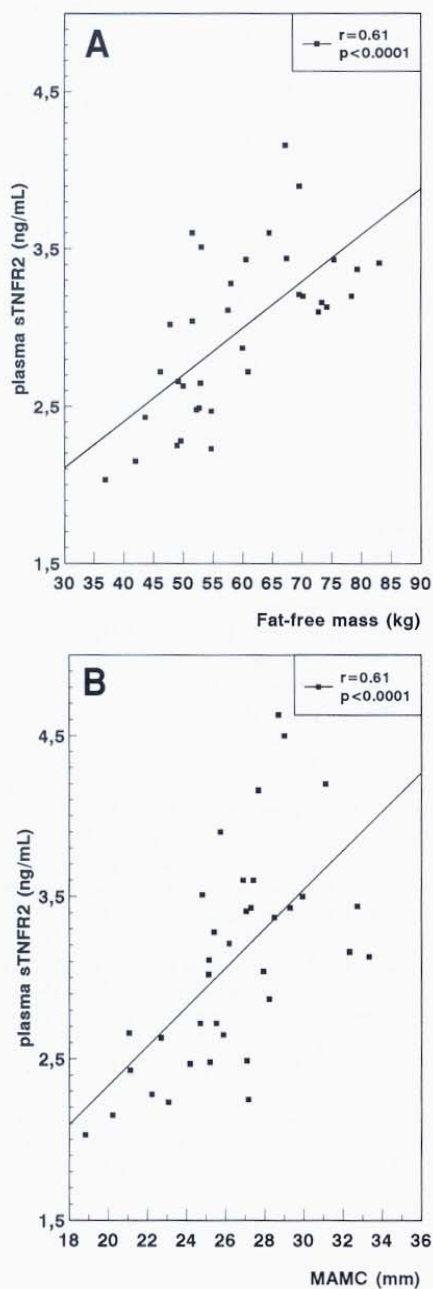


FIG. 1. Linear correlations between circulating sTNFR2 levels and FFM (A) and between sTNFR2 and MAMC (B).

We found differences in sTNFR2 but not in sTNFR1 levels between obese and lean subjects. These findings are identical to those described by Hotamisligil et al. (8). However, the differences were less marked, probably because in that study, obese women had a significantly higher mean BMI ( $39 \text{ kg/m}^2$ ). Adipose tissue TNFR2 expression was also associated with WHR in the latter study (8), and a similar relationship

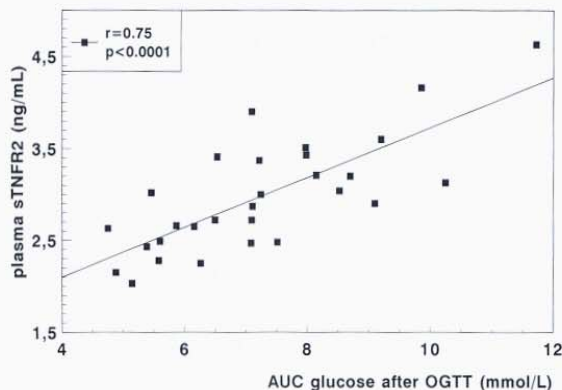


FIG. 2. Linear correlation between circulating sTNFR2 levels and AUC glucose after an OGTT in subjects with NGT.

between sTNFR2 and WHR has been found in this report. This correlation could merely reflect the degree of insulin resistance found in abdominal obesity, but we have demonstrated that both WHR and sTNFR2 independently predict insulin sensitivity in a multiple regression analysis. On the other hand, abdominal obesity is a well-known cardiovascular risk. In this sense, the correlation between sTNFR2 and AUC glucose is in concordance with recent finding in young postinfarction patients, in whom TNF- $\alpha$  correlated with fasting and postload glucose levels (28). Furthermore, circulating sTNFR2 levels were three times greater in patients with ischemic heart disease in a recent study (29).

The sTNFRs are present constitutively in serum at concentrations that increase significantly in both inflammatory and noninflammatory disease states (30). The effect of these proteins may differ, however, depending on their concentration at the site of TNF action, the relation of their concentration to the local concentration of TNF, and the rates at which the sTNFRs and TNF are cleared from the site of TNF action in relation to the decay of TNF activity (15). Thus, the TNFRs may in some situations inhibit the effects of TNF, in others, serve as carriers for TNF, and in some cases they may even augment the effects of TNF by prolonging its function (15).

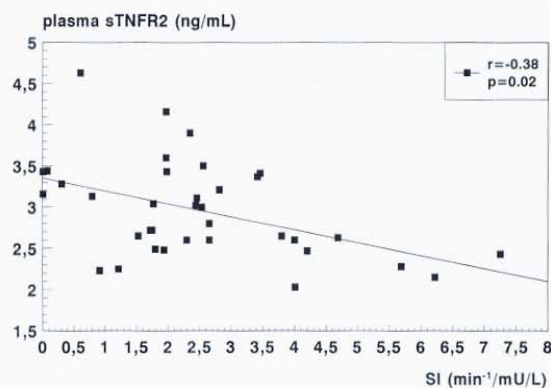


FIG. 3. Linear correlation between sTNFR2 and the  $S_1$  derived from the FSIGTT with minimal model analysis.



The increased levels of sTNFR2 in lean and obese men (with significantly increased FFM) in comparison with lean and obese women, and the correlations between sTNFR2 with BMI and FFM itself, suggest that circulating sTNFR2 is produced not only by the adipocyte but also possibly by the muscle. This hypothesis is supported by the correlations between two markers of the muscle compartment (MAMC and MAMA) and sTNFR2. Increased expression of TNF- $\alpha$  has been demonstrated at the muscle tissue (5). Because this latter tissue is the main target for insulin-stimulated glucose disposal (31,32), FFM constitutes, among other factors, a determinant of insulin sensitivity (33). In fact, a good correlation between FFM and insulin sensitivity was observed in our patients ( $r = -0.40$ ,  $P = 0.02$ ). On the other hand, gender-related differences in insulin sensitivity have been well characterized (34–38). Women are more insulin sensitive despite higher fat mass than men, and this is thought to be related to differences in FFM metabolism (34–38). Because TNF expression is variably increased with increased adiposity and is decreased with decreased adiposity (3), this variability could be partially explained by differences in FFM. It is tempting to speculate that the association between FFM and sTNFR2 might be attributed to increased production by the muscle of sTNFR2, leading to stabilization of TNF- $\alpha$  homotrimers, thus resulting in insulin resistance at the level of the adipocyte. This latter hypothesis would explain the differences in sTNFR2 in parallel with FFM and insulin sensitivity. Favoring this hypothesis, we have observed increased (two- to threefold) plasma levels of sTNFR1 and sTNFR2 in myopathies in parallel with insulin resistance (J.M.F.-R., J.M. Gomez, J.M. Matos, W.R., J.V., unpublished observations).

On the other hand, increased lean body mass leads to increased insulin sensitivity under many circumstances, such as after endurance or strength training. However, insulin utilizes a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent mechanism, whereas the exercise signal is initiated by calcium release from the sarcoplasmic reticulum leading to the activation of other signaling intermediaries (39). Indeed, the hypoglycemic response to insulin is only slightly affected by the level of training (40).

In summary, plasma sTNFR2 but not sTNFR1 levels were proportional to BMI, WHR, FFM (a well-known confounder in the evaluation of insulin sensitivity), basal and postload glucose levels, and insulin resistance. These findings support TNF- $\alpha$  as a system regulating insulin action in human obesity.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grant CICYT SAF 98-0130 and grant 93/1315 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, National Health Institute.

#### REFERENCES

1. Beutler B, Cerami A: The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* 7:625–655, 1989
2. Grunfeld C, Feingold KR: The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy* 3:143–158, 1991
3. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Sinsolo RB: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue: regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95:2111–2119, 1995
4. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409–2415, 1995
5. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA: The expression of TNF $\alpha$  by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97:1111–1116, 1996
6. Tartaglia LA, Goeddel DV: Two TNF receptors. *Immunol Today* 13:151–153, 1992
7. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG: The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959–962, 1994
8. Hotamisligil GS, Arner P, Atkinson RL, Spiegelman BM: Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes* 46:451–455, 1997
9. Bazzoni F, Beutler B: The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717–1725, 1996
10. Olsson I, Lantz M, Nilsson E, Peetre C, Thysell H, Grubb A: Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine. *Eur J Haematol* 42:270–275, 1989
11. Seckinger P, Isaacs S, Dayer J-M: Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibitor. *J Biol Chem* 264:11966–11973, 1989
12. Engelmann HD, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, Wallach D: A tumor necrosis factor binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J Biol Chem* 264:11974–11980, 1989
13. Engelmann HD, Novick D, Wallach D: Two tumor necrosis factor binding proteins purified from human urine: evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem* 265:1531–1536, 1990
14. Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Engelmann H, Zwarg R, Aderka D, Holtmann H, Wallach D: Soluble forms of tumor necrosis factors (TNF-Rs): the cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J* 9:3269–3278, 1990
15. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D: Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 175:323–329, 1992
16. Smith RA, Baglioni C: The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 262:6951–6954, 1987
17. Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I, Kaklamani V, Liolios A, Douglarakis DE, Griveas I, Katsilambros N, Plier JS: Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor- $\alpha$  system in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3408–3413, 1997
18. Fernández-Real JM, Gutiérrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernández-Castañer M, Vendrell J, Richart C, Soler J: The TNF- $\alpha$  Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 46:1468–1472, 1997
19. Fernández-Real JM, Gutiérrez C, Ricart W, Casamitjana R, Broch M, Vendrell J, Richart C: The TNF- $\beta$  Nco I polymorphism is not associated with hypertriglyceridemia or insulin resistance in lean and obese subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 236:829–832, 1997
20. Ricart W, Gonzalez-Huix F, Conde V, Grup per l'Evaluació de la Composició Corporal de Catalunya: The evaluation of the state of nutrition through the determination of anthropometric parameters: new tables in the working population in Catalonia (Spain). *Med Clin (Barc)* 100:681–691, 1993
21. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28:1039–1057, 1979
22. Bergman RN, Prager R, Volund A, Olefsky JM: Equivalence of the insulin sensitivity index in man derived by the minimal model method and euglycaemic glucose clamp. *J Clin Invest* 79:790–800, 1987
23. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87–91, 1993
24. Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271–1278, 1994
25. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665–668, 1996
26. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* 389:610–614, 1997
27. Winzen R, Wallach D, Kemper O, Resch K, Holtmann H: Selective upregulation of the 75-kDa tumor necrosis (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1. *J Immunol* 150:4346–4353, 1993
28. Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, Proudler A, Bavenholm P, Ericsson CG, Godland I, de Faire U, Nilsson J: Evidence for a role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metabolism* 47:113–118, 1998
29. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand J-B, Bies RD, Young JB, Mann DL: Tumor necrosis factor- $\alpha$  and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 93:704–711, 1996

sTNFR2 AND INSULIN RESISTANCE

30. Aderka D, Engelmann H, Hornik V, Skornick Y, Levo Y, Wallach D, Kustai G: Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res* 51:5602-5607, 1991
31. Hollenbeck C, Reaven GM: Variations in insulin-stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1169-1173, 1987
32. Reaven GM, Hollenbeck CB, Chen Y-DI: Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia* 32:52-55, 1989
33. Yki-Järvinen H, Koivisto VA: Effect of body composition on insulin sensitivity. *Diabetes* 32:965-969, 1983
34. Orchard TJ, Becker DJ, Kuller LH, Wagener D, LaPorte RE, Drash AI: Age and sex variations in glucose tolerance and insulin responses: parallels with cardiovascular risk. *J Chron Dis* 35:123-132, 1982
35. Yki-Järvinen H: Sex and insulin sensitivity. *Metabolism* 33:1011-1015, 1984
36. Hale PJ, Wright JV, Natrass M: Differences in insulin sensitivity between normal men and women. *Metabolism* 34:1133-1138, 1985
37. Paula FJA, Pimenta WP, Saad MJA, Paccola GMGF, Piccinato CD, Foss MC: Sex-related differences in peripheral glucose metabolism in normal subjects. *Diabetes Metab Rev* 15:234-239, 1990
38. Nuutila P, Knuuti J, Mäki M, Laine H, Ruotsalainen U, Teräs M, Haaparanta M, Solin O, Yki-Järvinen H: Gender and insulin sensitivity in the heart and in skeletal muscles: studies using positron emission tomography. *Diabetes* 44:31-36, 1995
39. Hayashi T, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ: Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol* 273:E1039-E1051, 1997
40. LeBlanc J, Nadeau A, Richard D, Tremblay A: Variations in plasma glucose, insulin, growth hormone, and catecholamines in response to insulin in trained and non-trained subjects. *Metabolism* 31:453-456, 1982



**ESTUDI 2.**

**POLYMORPHISM OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$  RECEPTOR 2 GENE IS ASSOCIATED WITH OBESITY, LEPTIN LEVELS, AND INSULIN RESISTANCE IN YOUNG SUBJECTS AND DIET-TREATED TYPE 2 DIABETIC PATIENTS. *Diabetes Care* 23:831-37, 2000.**

Pathophysiology/Complications  
ORIGINAL ARTICLE

# Polymorphism of the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Receptor 2 Gene Is Associated With Obesity, Leptin Levels, and Insulin Resistance in Young Subjects and Diet-Treated Type 2 Diabetic Patients

JOSÉ-MANUEL FERNÁNDEZ-REAL, MD, PHD  
JOAN VENDRELL, MD, PHD  
WIFREDO RICART, MD  
MONTSERRAT BROCH

CRISTINA GUTIERREZ, PHD  
ROSER CASAMITJANA, PHD  
JOSEP ORIOLA, PHD  
CRISTÓBAL RICHART, MD, PHD

**OBJECTIVE** — Mice lacking the tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 2 (*TNFR2*) gene fed a high-fat diet gain less weight and display reduced leptin and insulin levels. In humans, plasma levels of the soluble fraction of TNFR2 (sTNFR2) circulate in proportion to the degree of insulin resistance. The purpose of this study was to evaluate a polymorphism in the 3' untranslated region of the *TNFR2* gene on chromosome 1 in relation to BMI, leptin levels, and insulin resistance.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS** — Using single-strand conformation polymorphism, the polymorphism was analyzed in 107 nondiabetic subjects (60 women, 47 men) and in 110 consecutive patients with type 2 diabetes (79 women, 31 men). In a subset of 33 healthy subjects, insulin sensitivity (minimal model analysis) was also evaluated.

**RESULTS** — Four alleles of the *TNFR2* gene were identified (A1, A2, A3, and A4). BMI and serum leptin levels were significantly increased in young carriers of the A2 allele. Plasma sTNFR2 levels were similar among the different *TNFR2* gene variants. However, in subjects who did not carry the A2 allele, in young subjects, and in women, plasma sTNFR2 levels were proportional to BMI and leptin levels. In the study sample, carriers of the A2 allele ( $n = 18$ ) showed significantly increased BMI, fat mass, waist-to-hip ratio, serum total and VLDL triglyceride levels, and leptin levels and had a lower insulin sensitivity index than noncarriers of the A2 variant ( $n = 15$ ). The frequency of the different alleles among diabetic subjects was similar to that in the control population. However, diet-treated diabetic subjects ( $n = 49$ ) who were carriers of the A2 allele exhibited significantly higher BMI and leptin levels than diet-treated noncarriers of the A2 allele.

**CONCLUSIONS** — The presence of the A2 allele in the *TNFR2* gene may predispose subjects to obesity and higher leptin levels, which may in turn predispose them to insulin resistance or vice versa. The *TNFR2* gene may be involved in weight-control mechanisms.

*Diabetes Care* 23:831–837, 2000

From the Diabetes Unit (J.-M.F.-R., W.R.), Endocrinology and Nutrition, University Hospital of Girona "Dr. Josep Trueta," Girona; Endocrinology Unit (J.V., M.B., C.G., C.R.), Department of Medicine, University Hospital of Tarragona Joan XXIII, Rovira i Virgili University, Barcelona; and the Hormonal Laboratory (R.C., J.O.), University Hospital Clinic, Barcelona, Spain.

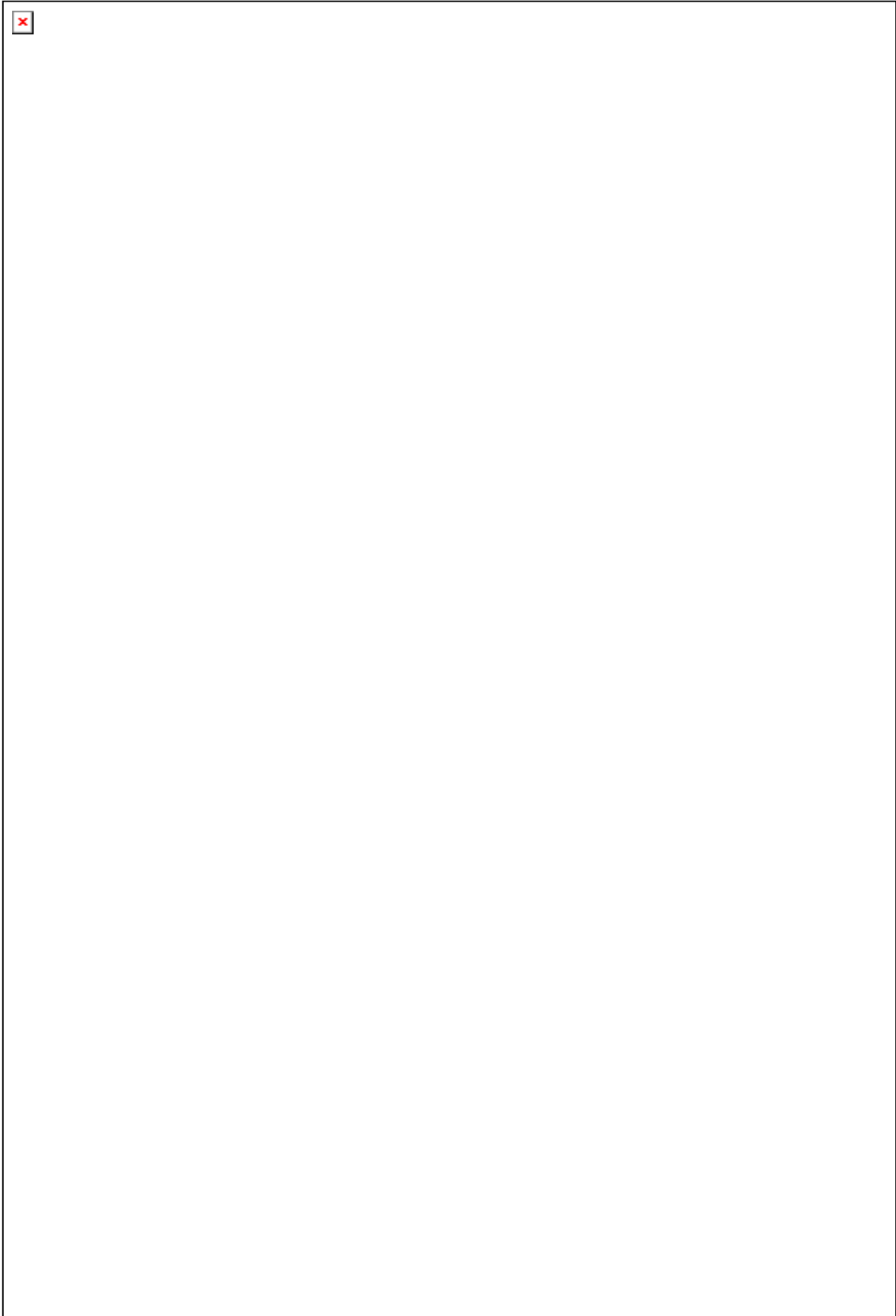
Address correspondence and reprint requests to José-Manuel Fernández-Real, MD, PhD, Department of Endocrinology, Hospital de Girona, Ctra. França S/N, 17007 Girona, Spain. E-mail: endocrino@htrueta.scs.es. Received for publication 26 October 1999 and accepted in revised form 15 February 2000.

**Abbreviations:** EASIA, enzyme-amplified sensitivity immunoassay; FSIVGTT, frequently sampled intravenous glucose tolerance test; PCR, polymerase chain reaction; sTNFR2, soluble fraction of tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TNFR1, tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 1; TNFR2, tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 2; UTR, untranslated region; WHR, waist-to-hip ratio.

A table elsewhere in this issue shows conventional and Système International (SI) units and conversion factors for many substances.

Increasing evidence exists that tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) plays a key role in mediating insulin resistance as a result of obesity (1–7). In numerous rodent models (1,2,7) of obesity-diabetes syndromes, TNF- $\alpha$  is overexpressed in the adipose and muscle tissues compared with tissues from lean animals. TNF- $\alpha$  blocks the action of insulin in cultured cells and in whole animals (1,2,7). The induction of insulin resistance is mediated through its ability to produce serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (7), which decreases the tyrosine kinase activity of the insulin receptor (2,7). Neutralization of TNF- $\alpha$  in obese *fa/fa* rats by intravenously administering a soluble TNF- $\alpha$  receptor-IgG chimeric protein or by using a replication-incompetent adenovirus 5 vector to endogenously express a TNF- $\alpha$  inhibitor gene substantially improved insulin sensitivity and restored the tyrosine kinase activity in fat and muscle (1,2). Recent studies have shown that mice lacking expression of the TNF- $\alpha$  ligand with a targeted null mutation in the gene encoding TNF- $\alpha$  were spared from obesity-induced deficiencies in insulin receptor signaling in fat and muscle tissues (8,9).

TNF- $\alpha$  signals through at least 2 known cell-surface receptors (TNFRs): TNFR1 (p55) and TNFR2 (p75) (10). In a recent study, mice lacking TNFR2 (p75<sup>-/-</sup>) that were fed a high-fat diet consistently gained less weight and displayed reduced insulin levels as an expression of improved insulin sensitivity than wild-type mice (11). The levels of circulating leptin were modulated by TNFR genotype. Male p75<sup>-/-</sup> mice that were fed chow had the lowest levels of plasma leptin after 4 and 18 h of fasting. High-fat-fed p75<sup>-/-</sup> mice were the only mice to display a decrease in leptin levels with increased fasting time (11). In another study in *ob/ob* mice, the absence of p55 caused a significant improvement in insulin sensitivity. A p75 deficiency alone did not affect insulin sensitivity but potentiated the effects of p55 deficiency in animals lacking both TNFRs (12).



**Table 1—Characterization of variants in 3' UTR (exon 10) of the TNFR2 gene and frequency of these variants in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects**

Nucleotides	Allele	Variant	Frequency	
			Nondiabetic subjects	Diabetic patients
593-598-620	G-T-T	A1	0.57	0.61
593-598-620	A-T-C	A2	0.34	0.35
593-598-620	A-G-T	A3	0.07	0.04
593-598-620	A-T-T	A4	0.005	0.004

Serum leptin concentrations were measured by radioimmunoassay in samples obtained after an overnight fast (Linco Research, St. Charles, MO). The lower limit of detection is 0.5 ng/ml. Intra- and interassay coefficients of variation were <7 and <8%, respectively. The radioimmunoassay for leptin does not cross-react with human proinsulin, insulin, or glucagon.

Plasma levels of sTNFR2 were determined by a solid-phase enzyme-amplified sensitivity immunoassay (EASIA) performed on a microtiter plate (Medgenix sTNF-R2 EASIA) as described elsewhere (23). The intra- and interassay coefficients of variation were <7 and <9%, respectively. The sTNFR2 EASIA does not cross-react with sTNFR1. TNF- $\alpha$  does not interfere with the assay.

**Detection of the TNFR2 3' UTR polymorphism by single-strand conformation polymorphism**

**Polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis.** A total of 250 ng genomic DNA was amplified with specific flanking primers for the 3' UTR of TNFR2 (191 base pair fragment) (36,37). Primer 1 was as follows: 5' AGGACTCTGAGGCT CTTTCT 3'. Primer 2 was as follows: 5' TCACAGAGAGTCAGGGACTT 3'. Polymerase chain reaction (PCR) conditions were 3 min at 93°C followed by 35 cycles consisting of 94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec with a final extension at 72°C for 9 min. PCR analysis was performed in 25  $\mu$ l of final volume containing 0.5  $\mu$ mol/l of each primer, 0.2  $\mu$ mol/l of each dNTP, 1.2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, and 1 U Taq DNA polymerase (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

A total of 3  $\mu$ l of each amplificate was mixed with 15  $\mu$ l of denaturing loading dye (98% formamide, 9.8 mmol/l Tris-Base, 8.9 mmol/l boric acid, 0.2 mmol/l EDTA, 6% glycerol, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) heated to 96°C for 10 min

and then placed directly on ice. Samples were then loaded onto a 12% acrylamide:bis (28:1) gel (without glycerol, at room temperature, 100 V constant for 17 h) and subsequent silver staining.

**DNA sequencing.** PCR analysis was performed under the same conditions as described above. DNA fragments were electrophoresed on 1% agarose gel (Life Technologies) purified with a QUIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced using a Taq Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Norwalk, CT) and a model DRA 373A sequencer (Perkin Elmer).

**Variations in the 3' UTR region (exon 10) of the TNFR2 gene**

A total of 3 electrophoretic patterns were detected in the region of exon 10 that was explored by PCR and single-strand conformation polymorphism analysis. DNA fragments with variable patterns were subsequently analyzed by direct sequencing. Two sequence variants (A3 and A4) were ascribed to 1 electrophoretic pattern, and a total of 4 sequence variants were identified. Characterization of the 4 variants are summarized in Table 1. To avoid a

misclassification of the studied population, all subjects with a possible A3 vs. A4 variant according to the electrophoretic pattern were sequenced, and we obtained a very low frequency of the A4 variant (0.004) in the whole population (Table 1).

**Statistical analyses**

Descriptive results of continuous variables are means  $\pm$  SD. Non-Gaussian distributed variables were log<sub>10</sub> transformed to achieve normality. This applied to serum leptin, insulin sensitivity, serum triglycerides, VLDL triglycerides, and sTNFR2. Comparison of variables across several groups of subjects was performed by 1-way analysis of variance using Fisher's test for multiple comparisons. Relationships between variables were determined by Pearson's correlation coefficient and stepwise multivariate linear regression analysis with forward selection. The regression coefficient generated by this analysis indicates the slope of the association between the dependent variable and the specified independent variable after adjusting for other independent variables in the model. The SEM represents the variability in this association, and the significance is reflected by the P value. The model R<sup>2</sup> indicates the percentage of the variance in the dependent variable that is accounted for by the independent variables included in the model. In the subgroup of subjects that were metabolically characterized, a logistical regression analysis was performed as follows: BMI was categorized as 0 or 1 according to the values below (0) or above (1) the median for the group of men and women, separately. TNFR2 variants were considered to be 0 in non-A2 subjects and

**Table 2—Characteristics of the study population**

Characteristic	Nondiabetic subjects			Subjects with type 2 diabetes		
	Non-A2	A2	P	Non-A2	A2	P
n	47	60	—	45	65	—
Men/women	21/26	26/34	NS	16/29	15/50	NS
Age (years)	42.8 $\pm$ 12	44.3 $\pm$ 11.5	NS	59.1 $\pm$ 8.9	58.9 $\pm$ 9.8	NS
Variant						
A1/A1		36			38	
A1/A2		42			51	
A2/A2		14			12	
A1/A3		8			6	
A2/A3		4			2	
A3/A3		2			—	
A1/A4		1			1	

Data are n or means  $\pm$  SD.

TNFR2 gene, obesity, and insulin resistance

Table 3—Influence of age and sex on the variables

	BMI (kg/m <sup>2</sup> )		P	Leptin (ng/ml)		P
	A2-allele carriers	Non-A2 allele		A2-allele carriers	Non-A2 allele	
Younger subjects	27.8 ± 5.17	25.7 ± 4.3	0.032	15.6 ± 11	9.5 ± 8.9	<0.05
Older subjects	28.1 ± 4.7	28.1 ± 4.6	NS	21.3 ± 19.2	13.1 ± 9.7	<0.05
Men	26.8 ± 4.6	27 ± 4.07	NS	8 ± 5.3	7.2 ± 7.1	NS
Women	28.5 ± 4.9	26.7 ± 5	0.04	22.1 ± 17	14 ± 9.8	<0.01

Data are means ± SD.

1 in subjects with the A2 allele. Insulin sensitivity index was also categorized as 0 or 1 according to the values below (0) or above (1) the median for the group of men and women separately and was considered the dependent variable. Levels of statistical significance were set at  $P < 0.05$ . All of these analyses were performed with the BMDP statistical package (Cork, Ireland).

**RESULTS** — The frequency of the variants in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects is shown on Table 1. Table 2 summarizes the characteristics of the study subjects at the time of entry into the study.

We observed a trend for higher BMI ( $29.9 \pm 5.3$  vs.  $27.6 \pm 4.9$  kg/m<sup>2</sup>,  $P = 0.08$ ) and significantly higher leptin levels ( $22.8 \pm 8.3$  vs.  $18.6 \pm 15.7$  ng/ml,  $P = 0.01$ ) in women homozygous for the A2/A2 variant ( $n = 16$ ). For this reason, we divided our population into carriers of the A2 allele (A2/A2, A1/A2, and A2/A3) and non-A2 carriers (A1/A1, A1/A3, A3/A3, and A1/A4) according to the presence or absence of the A2 variant.

Age and sex significantly influenced the results (Table 3). Younger subjects with the A2 allele ( $n = 61$ ) showed significantly increased BMI and leptin levels versus subjects with the non-A2 allele ( $n = 48$ ). Older A2 subjects showed similar BMI and increased leptin compared with non-A2 carriers. However, the latter differences were ascribed to an increased proportion of women among A2 carriers. When the study was performed separately according to sex, A2 women showed increased BMI and leptin levels compared with non-A2 women. In contrast, A2 men showed BMI and leptin levels similar to non-A2 men.

Similar findings were observed when the analysis was performed with nondiabetic or diabetic subjects. However, in the latter subjects, the differences were mainly observed in diet-treated patients ( $n = 49$ ). A2 diet-treated diabetic subjects exhibited

significantly higher BMI ( $29.2 \pm 4.6$  vs.  $26.4 \pm 3.6$  kg/m<sup>2</sup>,  $P = 0.038$ ) and leptin levels ( $14.2 \pm 9.1$  vs.  $8.4 \pm 6.8$  ng/ml,  $P < 0.05$ ) than non-A2 diet-treated diabetic patients (Fig. 1). In patients receiving oral hypoglycemic agents ( $n = 24$ ) or insulin ( $n = 37$ ), these differences were not observed.

Plasma sTNFR2 levels were measured in 76 subjects randomly selected (50% diabetic subjects, 50% control subjects). Plasma sTNFR2 levels positively correlated with age ( $r = 0.66$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 76$ ) (Fig. 2). The sTNFR2 levels were higher in younger men than in younger women ( $3.28 \pm 0.63$  vs.  $2.82 \pm 0.67$  ng/ml,  $P = 0.026$ ), and these differences were lost in older subjects. Plasma sTNFR2 levels were similar among A2 and non-A2 carriers. However, in non-A2 carriers, plasma sTNFR2 concentration was proportional to BMI (Pearson's  $r = 0.48$ ,  $P < 0.01$ ) and leptin levels ( $r = 0.48$ ,  $P < 0.01$ ). These associations were even stronger in non-A2 women ( $r = 0.55$ ,  $P = 0.015$ , and  $r = 0.65$ ,  $P < 0.01$ , for BMI and leptin, respectively). On the contrary, these associations were lost among A2 carriers.

In a multiple linear regression analysis conducted in a stepwise manner to predict leptin levels with BMI, age, sex, diabetes status, and TNFR2 gene variants as independent variables, the latter predicted leptin levels ( $P = 0.04$ ) independently of BMI ( $P < 0.0001$ ), age ( $P = 0.0001$ ), and sex ( $P = 0.0003$ ), which contributed to 49% of its variance.

Table 4 summarizes the characteristics of this subgroup of subjects (9 A2 women and 9 non-A2 women). A2 subjects showed significantly increased BMI, fat mass, WHR, serum triglycerides, VLDL triglycerides, and leptin levels and a lower insulin sensitivity index (Table 3) than non-A2 carriers. The differences were more marked among women. Again, plasma sTNFR2 levels correlated with BMI in non-A2 subjects ( $r = 0.73$ ,  $P < 0.01$ ) but not in A2 carriers ( $r = 0.36$ ,  $P = NS$ ). In a logistical regression analysis, both BMI ( $P = 0.04$ ) and TNFR2 polymorphism ( $P = 0.02$ ) independently predicted insulin sensitivity.

**CONCLUSIONS** — We have identified a polymorphism in the TNFR2 gene on chromosome 1 that was associated with higher BMI and leptin levels in nondiabetic subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. In contrast with the nondiabetic subjects, the diabetic patients treated with oral hypoglycemic agents or insulin were not found to differ in BMI according to the polymorphism of the TNFR2 gene. Potential differences among these patients may possibly have been masked by their concomitant hyperglycemia and its treatment.

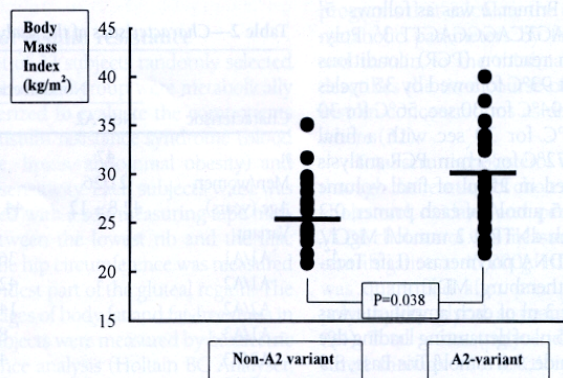


Figure 1—Differences in BMI according to the TNFR2 gene variants among diet-treated type 2 diabetic subjects.

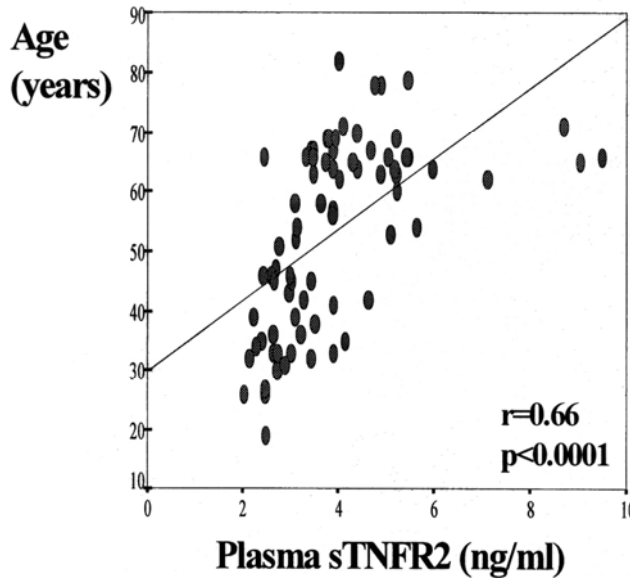


Figure 2—Linear association between plasma sTNFR2 and age in all subjects.

The *TNFR2* A2 allele could have been expected to be more frequent in subjects with type 2 diabetes than in nondiabetic subjects. However, heterogeneity of type 2 diabetes and the transversal design of our study constitute important confounders in interpreting these results. Our findings are somewhat limited by the relatively small study size, but they are consistent with experimental studies and human physiology. At this time, we can only speculate about the different activity of TNFR2 according to the different *TNFR2* gene variants that leads to differences in weight-control mechanisms.

The polymorphism in the 3' UTR segment of the *TNFR2* gene may encompass mRNA destabilizing signals, thus affecting mRNA stability and leading to a reduction in the abundance of TNFR2 mRNA in adipose or skeletal muscle. Nevertheless, the polymorphisms in the *TNFR2* gene may possibly represent markers for yet another susceptibility gene in this region that could be the basis for the observed associations. In this sense, a single-gene rodent mutation (diabetes) and a quantitative trait locus (dietary obese 1) mapped to the midportion of mouse chromosome 4 have been related to obesity and/or insulin levels. Synteny relationships place their putative human homologs on 1p31 and on 1p35 through p31, respectively, which are very

close to the *TNFR2* gene location (on chromosome 1p36.2) (36–38). In this respect, our findings agree with those of Chagnon et al. in the Quebec Family Study (39). In that report, suggestive linkages between several microsatellite markers from 1p32 to p22 and for BMI, fat mass, and fasting insulin were found. In fact, chromosome 1 is one of the few chromosomes showing at

least 3 putative loci related to obesity in both arms (40).

Of interest is the relationship between sTNFR2 levels and BMI and between sTNFR2 and leptin in subjects in whom the *TNFR2* gene variants determined differences in BMI and leptin. Plasma sTNFR2 concentration is believed to be a surrogate of previous TNF- $\alpha$  action because TNF- $\alpha$  selectively upregulates the 75-kDa TNFR (41). The sTNFR2 levels were proportional to BMI and leptin in young subjects but not in older subjects. The sTNFR2 levels were proportional to BMI and leptin in women, who were the subjects in whom the *TNFR2* gene variants marked more differences in BMI and leptin. Interestingly, the attenuation of body weight in *p75<sup>-/-</sup>* mice was sex specific (11). Finally, sTNFR2 levels were proportional to BMI and leptin among non-A2 subjects. One may be tempted to speculate that, when the leptin–TNF- $\alpha$  axis feedback is functioning (i.e., in non-A2 subjects), the result is a lower BMI and concomitantly lower leptin levels. In our hypothesis, subjects with a disrupted leptin–TNF- $\alpha$  axis (A2 subjects and older individuals) would be prone to higher BMI and leptin levels with disproportionately higher sTNFR2 levels. In our study sample, both BMI ( $r = 0.19$ ,  $P = 0.007$ ) and leptin levels ( $r = 0.25$ ,  $P < 0.01$ ) correlated with age as previously reported (27). Researchers have previously noted that the relationship between fat content and leptin is disrupted in elderly subjects and thus possibly contributes to the obesity that occurs with age (27).

Table 4—Anthropometric and biochemical variables of nondiabetic subjects (selected subgroup)

Variable	Non-A2 subjects	A2 subjects	P
n	15	18	NS
Age (years)	36.6 $\pm$ 6.5	34.7 $\pm$ 7	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.6 $\pm$ 5.3	30.7 $\pm$ 4.8	0.002
WHR	0.94 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.06	0.014
Fat mass (kg)	18.42 $\pm$ 10.7	27.3 $\pm$ 12.7	0.04
Systolic blood pressure (mmHg)	118.7 $\pm$ 13.9	125.3 $\pm$ 7.2	NS
Diastolic blood pressure (mmHg)	69 $\pm$ 12.3	76.8 $\pm$ 9.8	NS
AUC glucose during OGTT (mmol/l)	8.1 $\pm$ 3.6	8.37 $\pm$ 2.5	NS
AUC insulin after OGTT (mU/l)	58.5 $\pm$ 26.5	89.4 $\pm$ 48	0.04
Insulin sensitivity (min $\cdot$ mU <sup>-1</sup> $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	3.7 $\pm$ 1.7	1.9 $\pm$ 1.3	0.003
Cholesterol (mmol/l)	4.85 $\pm$ 0.8	5.3 $\pm$ 1	NS
LDL cholesterol (mmol/l)	3.3 $\pm$ 0.93	3.8 $\pm$ 0.9	NS
HDL cholesterol (mmol/l)	1.29 $\pm$ 0.42	1.07 $\pm$ 0.21	NS (0.07)
Triglycerides (mmol/l)	0.95 $\pm$ 0.42	1.52 $\pm$ 0.75	0.012
VLDL triglycerides (mmol/l)	0.52 $\pm$ 0.37	0.94 $\pm$ 0.6	0.02
Serum leptin (ng/ml)	10.1 $\pm$ 8	18 $\pm$ 12.3	0.03
Plasma sTNFR2 (ng/ml)	2.91 $\pm$ 0.58	2.96 $\pm$ 0.68	NS

Data are n or means  $\pm$  SD. AUC, area under the curve; OGTT, oral glucose tolerance test.

*TNFR2 gene, obesity, and insulin resistance*

An important finding of our study was that the *TNFR2* gene variants were associated with insulin sensitivity independently of BMI. Subjects with the A2 allele showed several characteristics of the insulin resistance syndrome: increased WHR, postglucose load insulin levels, and hypertriglyceridemia in association with a lower insulin sensitivity index. The A2 allele would constitute one of the few genotype markers for insulin resistance. Whether the latter is a cause or consequence of an impaired leptin-TNF- $\alpha$  axis is only a matter for speculation. In different animal models, leptin administration increased insulin sensitivity both under fasting conditions and in the presence of hyperinsulinemia at clamped glucose and also increased glucose utilization by 30% (42–44). In humans, leptin is involved in sex-related differences in insulin sensitivity: women are more insulin sensitive than men despite increased fat mass (45). The increased insulin sensitivity of women is perhaps the result of downregulation of TNF- $\alpha$  induced by leptin.

Plasma levels of sTNFR2 have been described to circulate in proportion to the degree of insulin resistance in young non-diabetic subjects (21). However, we did not detect differences in sTNFR2 levels among the different *TNFR2* gene variants. We cannot exclude that age, diabetes status, or diabetes complications affect metabolism or clearance of sTNFR2 and thus lead to disproportionate plasma sTNFR2 levels. Moreover, we cannot exclude that other factors may have influenced our results. For example, in very obese people, TNF- $\alpha$  production tends to decrease (46), and the insulin resistance state is maintained in all likelihood by hyperglycemia and high levels of free fatty acids. For this reason, we considered morbid obesity to be an exclusion criterion.

In conclusion, the *TNFR2* gene polymorphism is independently associated with obesity in healthy subjects and diet-treated type 2 diabetic subjects, with higher leptin levels and with insulin resistance. Determining the molecular mechanisms by which a change in the *TNFR2* gene leads to phenotypic differences will provide important insights into the genetic basis of insulin resistance.

**Acknowledgments** — This work was partially supported by Grant CICYT SAF 98-0130 and Grant 98/0808 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, National Health Institute.

**References**

- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87–91, 1993
- Cheung AT, Ree D, Kolls JK, Fuselier J, Coy DH, Bryer-Ash M: An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signalling by TNF- $\alpha$ . *Endocrinology* 139:4928–4935, 1998
- Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a key component of the obesity–diabetes link. *Diabetes* 43:1271–1278, 1994
- Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue: regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95:2111–2119, 1995
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409–2415, 1995
- Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA: The expression of TNF $\alpha$  by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97:1111–1116, 1996
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665–668, 1996
- Ventre J, Doebber T, Wu M, Macnaul K, Stevens K, Pasparakis M, Kollas G, Moller DE: Targeted disruption of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 46:1526–1531, 1997
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* 389:610–614, 1997
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG: The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 76:959–962, 1994
- Schreyer SA, Chua SC, LeBoeuf RC: Obesity and diabetes in TNF- $\alpha$  receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 102:402–411, 1998
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Hotamisligil GS: Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF- $\alpha$ -mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 139:4832–4838, 1998
- Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R: Effect of an engineered human anti-TNF- $\alpha$  antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45:881–885, 1996
- Fernández-Real JM, Gutiérrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernández-Castañer M, Vendrell J, Soler J, Richart C: The TNF- $\alpha$  Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 46:1468–1472, 1997
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW: Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3195–3199, 1997
- Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F: Polymorphisms of the tumour necrosis factor- $\alpha$  gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest* 28:59–66, 1998
- Hotamisligil GS, Arner P, Atkinson RL, Spiegelman BM: Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes* 46:451–455, 1997
- Engelmann HD, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, Wallach D: A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J Biol Chem* 264:11974–11980, 1989
- Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Engelmann H, Zwarg R, Aderka D, Holtmann H, Wallach D: Soluble forms of tumor necrosis factors (TNF-Rs): the cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J* 9:3269–3278, 1990
- Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D: Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 175:323–329, 1992
- Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutiérrez C, Vendrell J, Richart C: Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor alpha receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 47:1757–1762, 1998
- Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollock A, Moser A, Friedman J, Feingold KR: Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the *ob* gene product, in hamsters: a role for leptin in the anorexia of infection. *J Clin Invest* 97:2152–2157, 1996
- Kirchgesner TG, Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS: Tumor necrosis factor- $\alpha$  contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J Clin Invest* 100:2777–2782, 1997
- Qian H, Hausman GJ, Compton MM, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA: Leptin regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , tumor necrosis factor, and uncoupling protein-2 expression in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun*

- 246:660-667, 1998
25. Zumbach MS, Boehme MW, Wahl P, Stremmel W, Ziegler R, Nawroth PP: Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4080-4082, 1997
  26. Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I, Kaklamani V, Liolios A, Doulgerakis DE, Griveas I, Katsilambros N, Flier JS: Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor- $\alpha$  system in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3408-3413, 1997
  27. Moller N, O'Brien P, Nair KS: Disruption of the relationship between fat content and leptin levels with aging in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 83:931-934, 1998
  28. Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, Carella C, Giugliano D, Varicchio M, D'Onofrio F: Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol* 275 (2 Pt. 1): E294-E299, 1998
  29. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, Murata K, Takarada Y, Ito K, Fuji M, Tsuchihashi K, Goto H, Nakatani K, Yano Y: Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  are increased in obese patients with noninsulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83:859-862, 1998
  30. Zinman B, Hanley AJ, Harris SB, Kwan J, Fantus IG: Circulating tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 84:272-278, 1999
  31. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28:1039-1057, 1979
  32. Bergman RN, Prager R, Volund A, Olefsky JM: Equivalence of the insulin sensitivity index in man derived by the minimal model method and euglycaemic glucose clamp. *J Clin Invest* 79:790-800, 1987
  33. Siedel J, Hagele EO, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW: Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem* 29: 1075-1080, 1983
  34. Kostner GM, Molinari E, Pichler P: Evaluation of a new HDL2/HDL3 quantitation method based on precipitation with polyethylene glycol. *Clin Chim Acta* 148:139-147, 1985
  35. Wahlefeld AW: Lipoproteins. In *Methoden der Enzymatischen Analyse*. Vol. 2, 3rd ed. Bergmeyer HU, Ed. Weinheim, Germany, Verlag Chemie, 1974, p. 187-188
  36. Kaufman BA, White PS, Brodeur G: A complex single strand conformational polymorphism (SSCP) in the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) gene on chromosome 1p36.2. *Hum Mol Genet* 2:824, 1993
  37. Kaufman BA, White PS, Steinbrueck T, Donis-Keller H, Brodeur GM: Linkage mapping of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) gene to 1p36.2 using the single strand conformation polymorphism technique. *Hum Genet* 94:418-422, 1994
  38. Baker E, Chen LZ, Smith CA, Cullen DF, Goodwin R, Sutherland GR: Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogenet Cell Genet* 57: 117-118, 1991
  39. Chagnon YC, Perusse L, Lamothe M, Chagnon M, Nadeau A, Dionne FT, Gagnon J, Chung WK, Leibel RL, Bouchard C: Suggestive linkages between markers on human 1p32-p22 and body fat and insulin levels in the Quebec Family Study. *Obes Res* 5:115-121, 1997
  40. Chagnon YC, Perusse L, Bouchard C: The human obesity gene map: the 1997 update. *Obes Res* 6:76-92, 1998
  41. Winzen R, Wallach D, Kemper O, Resch K, Holtmann H: Selective upregulation of the 75-kDa tumor necrosis (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1. *J Immunol* 150: 4346-4353, 1993
  42. Sivitz WI, Walsh SA, Morgan DA, Thomas MJ, Haynes WG: Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology* 138:3395-3401, 1997
  43. Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L: Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest* 100:3105-3110, 1997
  44. Koyama K, Chen G, Wang M-Y, Lee Y, Shimabukuro M, Newgard CB, Unger RH:  $\beta$ -cell function in normal rats made chronically hyperleptinemic by adenovirus-leptin gene therapy. *Diabetes* 46:1276-1280, 1997
  45. Fernández-Real JM, Casamitjana R, Ricart W: Leptin is involved in gender related differences in insulin sensitivity. *Clin Endocrinol* 49:505-512, 1998
  46. Peraldi P, Spiegelman B: TNF- $\alpha$  and insulin resistance: summary and future prospects. *Mol Cell Biochem* 182:169-175, 1998



**ESTUDI 3.**

**INTERLEUKIN-6 GENE POLYMORPHISM AND INSULIN SENSITIVITY.**

**Diabetes 49:517-20, 2000.**

## Brief Genetics Report

# Interleukin-6 Gene Polymorphism and Insulin Sensitivity

José-Manuel Fernández-Real, Montserrat Broch, Joan Vendrell, Cristina Gutiérrez, Roser Casamitjana, Michel Pugeat, Cristóbal Richart, and Wifredo Ricart

Type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome have been hypothesized to constitute manifestations of an ongoing acute-phase response. We aimed to study an interleukin-6 (*IL-6*) gene polymorphism in relation to insulin sensitivity (*IL-6* is the main cytokine involved in an acute-phase response). Subjects homozygous for the C allele at position -174 of the *IL-6* gene (*Sfa*NI genotype), associated to lower plasma *IL-6* levels, showed significantly lower integrated area under the curve of serum glucose concentrations ( $AUC_{\text{glucose}}$ ) after an oral glucose tolerance test, lower blood glycosylated hemoglobin, lower fasting insulin levels, lower total and differential white blood cell count (a putative marker of peripheral *IL-6* action), and an increased insulin sensitivity index than carriers of the G allele, despite similar age and body composition. A gene dosage effect was especially remarkable for  $AUC_{\text{glucose}}$  (6.4 vs. 9.3 vs. 9.7 mmol/l in C/C, C/G, and G/G individuals, respectively). The serum concentration of fully glycosylated cortisol binding globulin (another marker of *IL-6* action), suggested by concanavalin A adsorption, was lower in C/C subjects than in G/G individuals ( $32.6 \pm 2.9$  vs.  $37.6 \pm 4.6$  mg/l,  $P = 0.03$ ). In summary, a polymorphism of the *IL-6* gene influences the relationship among insulin sensitivity, postload glucose levels, and peripheral white blood cell count. *Diabetes* 49:517-520, 2000

It has been hypothesized that type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome are partly a manifestation of an ongoing acute-phase response (1,2). This hypothesis is based on the findings of increased blood concentrations of markers of the acute-phase response,

From Unitat de Diabetologia, Endocrinologia i Nutricio (J.M.F.-R., W.R.), University Hospital of Girona "Dr Josep Trueta," Girona, Spain; Unitat d'Endocrinologia (M.B., J.V., C.G., C.R.), Hospital of Tarragona "Joan XXIII," Facultat Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; Laboratoire de la Clinique Endocrinologique (M.P.), Hospices Civils de Lyon, Hôpital de l'Antiquaille; INSERM U329 (M.P.), Lyon, France; and the Hormonal Laboratory (R.C.), University Hospital Clinic, Barcelona, Spain.

Address correspondence and reprint requests to J.M. Fernández-Real, MD, PhD, Unitat de Diabetologia, Endocrinologia i Nutricio, University Hospital of Girona "Dr Josep Trueta," Carretera de França s/n, 17007 Girona, Spain. E-mail: endocrino@htrueta.scs.es.

Received for publication 22 June 1999 and accepted in revised form 4 November 1999.

$AUC_{\text{glucose}}$ , integrated area under the curve of serum glucose concentrations; CBG, cortisol binding globulin; ConA, concanavalin A; FSI-VGT, frequently sampled intravenous glucose tolerance test; IL, interleukin; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment-length polymorphism; WBC, white blood cell.

including C-reactive protein, serum amyloid-A,  $\alpha$ -1 acid glycoprotein, sialic acid, and cortisol (1-4).

Interleukin (*IL-6*) is a pleiotropic cytokine involved in the regulation of the acute-phase reaction, immune responses, and hematopoiesis. Plasma *IL-6* levels are elevated in type 2 diabetic patients, particularly in those with features of the insulin resistance syndrome (1,2). Although the concentrations of multiple components of the acute-phase response increase together, not all of them increase uniformly in all patients. These variations indicate that the components of the acute-phase response are individually regulated, and this may be explained in part by differences in the pattern of production of specific cytokines (5). Recently, it has been reported that a polymorphism in the 5' flanking region of the *IL-6* gene alters the transcriptional response to stimuli such as endotoxin and *IL-1* (6).

In addition to its role in acute-phase response, *IL-6* has been recently shown to be released by adipose tissue, and this release is greater in obese subjects, especially in those with a higher waist-to-hip ratio (7). Furthermore, *IL-6* increases postprandially, in parallel to glucose and insulin levels, in the interstitial fluid of subcutaneous adipose tissue (8). This increase suggests that *IL-6* might modulate adipose glucose metabolism in the fed state.

A G/C polymorphism of the *IL-6* gene at position -174 has been found to be associated with different transcription rates. Specifically, subjects with the C/C genotype showed lower plasma *IL-6* levels compared with G/C or G/G subjects (6). Given the higher *IL-6* levels found in patients with the insulin resistance syndrome and the possible role of *IL-6* in postprandial adipose glucose metabolism, we aimed to study the G/C polymorphism of *IL-6* in relation to postload glucose levels and insulin sensitivity.

Anthropometric and biochemical characteristics of the subjects at the time of entry into the study are shown in Table 1. The sample of 32 subjects was divided into two groups on the basis of *IL-6* genotype. Of the subjects, 21 had a G at position -174 of the *IL-6* gene: 13 heterozygous (C/G) and 8 homozygous (G/G). There were 11 subjects homozygous for the presence of C at this position.

Subjects homozygous for the C allele, associated with lower plasma levels of *IL-6* in a recent study (6), were similar in age, sex, BMI, fat mass, and waist-to-hip ratio in comparison with carriers of the G allele (Table 1). However, these subjects showed significantly lower fasting insulin levels and an increased insulin sensitivity index than carriers of the G allele (Table 1). The integrated area under the curve of

IL-6 GENE AND INSULIN SENSITIVITY

TABLE 1  
 Anthropometric and biochemical variables of the study subjects

Variable	C/C	G/C and G/G	P
n	11	21	—
Men/women	5/6	10/11	NS
Age (years)	36.8 ± 8.6	37.5 ± 6.7	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.2 ± 5.7	28.7 ± 5.1	NS
Fat mass (kg)	23.8 ± 12.5	24.9 ± 9.9	NS
Fat-free mass (kg)	58 ± 15.1	56.4 ± 11.7	NS
Waist-to-hip ratio			
Men	0.98 ± 0.03	1.01 ± 0.05	NS
Women	0.89 ± 0.06	0.91 ± 0.06	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	118.6 ± 12.6	128.1 ± 11.4	0.064
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.5 ± 5.4	77.5 ± 12.7	0.059
Fasting glucose (mmol/l)	4.92 ± 0.43	5.56 ± 0.99	0.051
Fasting insulin (mU/l)	8.2 ± 2.8	12.7 ± 7.7	0.02
AUC glucose during OGTT (mmol/l)	6.4 ± 1.2	9.5 ± 3.3	0.001
AUC insulin during OGTT (mU/l)	69.1 ± 30.6	93.7 ± 71.7	NS
Insulin sensitivity (min · mU <sup>-1</sup> · l <sup>-1</sup> )	3.49 ± 1.6	2.27 ± 1.8	0.016
HbA <sub>1c</sub> (%)	4.62 ± 0.24	5.18 ± 0.66	0.002

Data are means ± SD. AUC, area under the curve; OGTT, oral glucose tolerance test.

serum glucose concentrations (AUC<sub>glucose</sub>) after an oral glucose tolerance test (Fig. 1) and blood glycosylated hemoglobin were significantly lower in these subjects (Table 1) in the presence of nonsignificantly different integrated insulin levels. A gene dosage effect was especially remarkable for AUC<sub>glucose</sub> (6.4 vs. 9.38 vs. 9.7 mmol/l in C/C, C/G, and G/G individuals, respectively) despite similar age, BMI, fat mass, and fat-free mass among these groups.

We measured peripheral white blood cell (WBC) count and used it as a marker of peripheral IL-6 action. As shown in Table 2 and Fig. 2, subjects homozygous for the C allele dis-

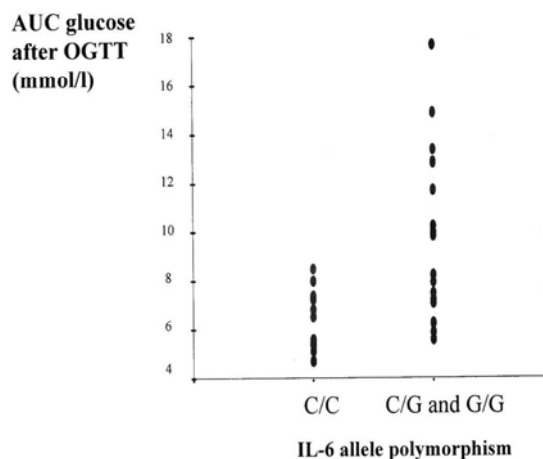


FIG. 1. Area under the curve of glucose during an oral glucose tolerance test (OGTT) according to the IL-6 genotype.

played significantly lower total and differential WBC count in comparison with carriers of the G allele. Insulin sensitivity significantly correlated with peripheral WBC count ( $r = -0.48, P = 0.001$ ), neutrophil count ( $r = -0.50, P = 0.001$ ), and lymphocyte count ( $r = -0.34, P = 0.02$ ).

Plasma levels of glycosylated cortisol binding globulin (CBG) were not significantly different among groups of subjects. However, C/C homozygous individuals showed significantly lower plasma glycosylated CBG ( $32.6 \pm 2.9$  vs.  $37.6 \pm 4.6$  mg/l,  $P = 0.03$ ) than G/G individuals.

We describe here that a polymorphism of the IL-6 gene at position -174 is associated with insulin resistance, postload glucose levels, and with two markers of putative IL-6 action, peripheral WBC count, and glycosylated CBG (12-14). When comparing constructs of the 5' flanking region of IL-6 in a luciferase reporter vector transiently transfected into HeLa cells, the -174 C construct showed lower expression than the -174 G construct (6). This different transcription rate was supported by the in vivo observation that IL-6 levels were lower in normal subjects with the C/C genotype (6). From our findings, it could be speculated that those individuals with the G allele would be prone to develop insulin resistance and increased plasma markers of the acute-phase response. The mechanism by which IL-6 would induce insulin resistance is unknown. The M value (a measure of insulin sensitivity), obtained using a euglycemic-hyperinsulinemic glucose clamp, was significantly lower in the patients with cancer that displayed increased circulating IL-6 levels (9). IL-6 stimulates the release of ACTH. In fact, higher cortisol levels, a well-known inducer of insulin resistance, are described in type 2 diabetic patients with the insulin resistance syndrome (1). However, it should be kept in mind that cytokines operate both as a cascade and as a network and can regulate the production of other cytokines and cytokine receptors (5). In this sense, perhaps the increased production of IL-6 is merely reflecting the actions of other cytokines more closely involved in insulin resistance, such as tumor necrosis factor- $\alpha$ .

Smaller numbers of peripheral blood neutrophils in IL-6 knockout mice have been observed (10,11). A higher peripheral WBC count has been associated with insulin resistance since the preliminary observations of Facchini et al. (12). In particular, it was observed that WBC count significantly correlated with insulin-mediated glucose disposal during a euglycemic clamp (12). In a subsequent study, it was demonstrated that neutrophil and lymphocyte count correlated positively with several components of the insulin resistance syndrome and that plasma insulin concentration was specifically asso-

TABLE 2  
 Indirect parameters of IL-6 action

Variable	C/C	G/C and G/G	P
White blood cell count ( $\times 10^9$ /ml)	5,490 ± 1,553	7,528 ± 1,854	0.002
Neutrophils ( $\times 10^9$ /ml)	3,085 ± 881	4,270 ± 1,348	0.008
Lymphocytes ( $\times 10^9$ /ml)	1,812 ± 529	2,384 ± 451	0.001
Monocytes ( $\times 10^9$ /ml)	449 ± 199	633 ± 210	0.01
CBG (mg/l)	33.4 ± 2.9	35.7 ± 6.7	NS
Glycosylated CBG (mg/l)	32.6 ± 2.9	34.9 ± 6.5	NS

Data are means ± SD.

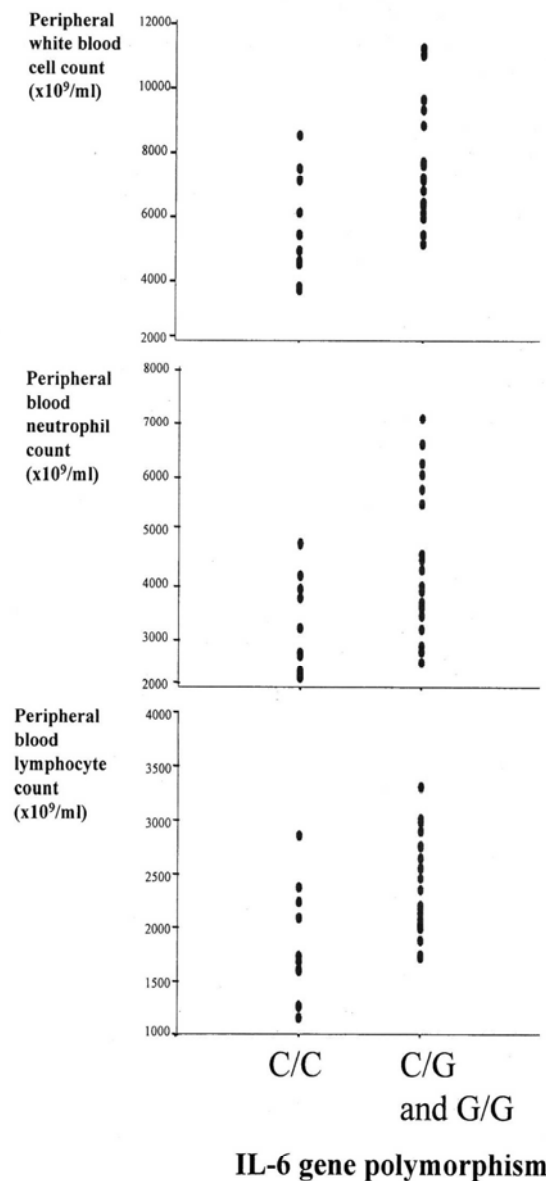


FIG. 2. Peripheral WBC count according to the IL-6 genotype.

ciated with lymphocytes and monocytes (13). These associations were confirmed in our study subjects. Given that IL-6 is involved in hematopoiesis (14), we suggest that these associations might in part be due to different IL-6 levels attributed to the IL-6 polymorphism at position -174. Those subjects with the G allele would be prone, simultaneously, to insulin resistance and higher peripheral WBC counts.

Given that IL-6 induces posttranslational changes in acute-phase protein glycosylation through oligosaccharide branching (15), we studied the glycosylation of CBG, a negative acute-phase protein (16). We did not find significant differences in plasma glycosylated CBG among subjects with dif-

ferent IL-6 genotypes. However, when comparing C/C homozygotes with G/G homozygotes, subjects of the latter group displayed significantly higher plasma concentrations of glycosylated CBG. In addition, the individuals that showed the highest glycosylated CBG levels were those with the G allele—presumably those with the higher IL-6 levels. Thus, the percentage of fully glycosylated CBG, as suggested by concanavalin A (ConA) adsorption, was higher in those G/G subjects who are believed to show a high IL-6 secretion rate. By increasing CBG glycosylation, IL-6 may decrease the half-life (or plasma clearance rate) of CBG with a consequent increase in its serum concentration.

We did not measure plasma IL-6 levels because of their low plasma half-lives and the presence of blocking factors. The circulating cytokine molecules are seldom found in the unbound state. They are almost always bound to binding or carrier proteins, autoantibodies, and soluble receptors. The usual sandwich format immunoassays recover free and some predictably bound cytokines, but miss other cytokines bound by unpredictable binding entities and cytokines not revealed by the kinetics of the assay protocol. We indirectly measured the effects of IL-6 through peripheral WBC count and glycosylated CBG.

Considerable interethnic variation in the frequencies of polymorphisms of IL-6 has been demonstrated (6,17), which is consistent with the different allelic frequency obtained in our study in comparison with other populations (6).

In summary, a polymorphism of the IL-6 gene influences the relationship among insulin sensitivity, postload glucose levels, and peripheral blood cell count. In evolutionary terms, we have hypothesized that genetic predisposition to insulin resistance and inflammation could be beneficial in the response to starvation and injury for our ancestors (18), a matter that merits further research.

#### RESEARCH DESIGN AND METHODS

**Subjects.** There were 32 healthy subjects (15 men and 17 women) prospectively studied. All subjects were of Caucasian origin from Catalonia (northern part of Spain). Inclusion criteria were as follows: 1) BMI (weight in kilograms divided by the square of height in meters) <40 kg/m<sup>2</sup>, 2) absence of any systemic disease, and 3) absence of any infections in the previous month. None of the subjects were taking any medication (including glucocorticoids or estrogens) or had any evidence of metabolic disease other than obesity. Liver disease and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical workup. The protocol was approved by the Hospital Ethics Committee, and informed consent was obtained from each subject.

**Procedures.** Anthropometric parameters, blood pressure, and post-oral load glucose and insulin levels were measured as previously reported (19).

Insulin sensitivity was analyzed using the frequently sampled intravenous glucose tolerance test (FSIVGT) with minimal model analysis as described elsewhere (19).

The serum glucose level during the FSIVGT was measured in duplicate by the glucose oxidase method with a glucose analyzer 2 (Beckman, Brea, CA). The coefficient of variation was 1.9%. The serum insulin level during the FSIVGT was measured in duplicate by monoclonal immunoradiometric assay (IRMA; Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). Intra- and interassay coefficients of variation were similar to those previously reported (19). Blood HbA<sub>1c</sub> concentrations were analyzed by high-pressure liquid chromatography (Merck Diagnostics, Rahway, NJ), with coefficients of variation <4%. The range for HbA<sub>1c</sub> in glucose tolerant subjects was 3.8–5.43%.

**White blood total and differential cell count.** White blood total and differential cell count was determined by routine laboratory tests (Coulter Electronics, Hialeah, FL).

**CBG and glycosylated CBG measurements.** Plasma CBG concentration was measured by using a radioimmunoassay as previously described (20). To analyze glycoform variation of CBG, serum samples (50 µl) were subjected to ConA sepharose adsorption (300 µl in 50% Tris buffer [50 mmol/l Tris HCl, pH 7.4, 0.5 mol/l NaCl, 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l MnCl<sub>2</sub>]). The con-

IL-6 GENE AND INSULIN SENSITIVITY

centration of CBG was measured in the supernatant of the ConA gel for calculating the percentage of CBG that was adsorbed by ConA and referred to as "glycosylated CBG."

**Restriction fragment-length polymorphism IL-6 gene analysis.** The *Sfa*NI polymorphism is due to a replacement of G by C at position 174, and primers were designed to amplify the promoter region of the *IL-6* gene. The primers used in the polymerase chain reaction (PCR) were as follows: 5' TGACTTCAGCTTTA CTCTTTGT 3' and 5' CTGATTGGAACCTTATTAAG 3'. The reaction was carried out in a final volume of 50 µl containing 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/l of each dNTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 0.2 mmol/l of each primer, and 2.5 U Taq polymerase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). DNA was amplified during 35 cycles with an initial denaturation of 10 min at 94°C and a final extension of 10 min at 72°C. The cycle program consisted of 1 min denaturation at 94°C, 1 min and 35 s annealing at 55°C, and 1 min extension at 72°C. PCR products were digested with *Sfa*NI restriction enzyme at 37°C overnight and electrophoresed on a 2% agarose gel. *Sfa*NI restriction fragment-length polymorphism (RFLP) was detected by ethidium bromide staining.

DNA was extracted from cellular blood components by the salting-out method. PCR was used to detect the *IL-6 Sfa*NI RFLP. The identified genotypes were named according to the presence or absence of the enzyme restriction sites, so *Sfa*NI G/G, G/C, and C/C are homozygous for the presence of the site (140/58 bp), heterozygotes for the presence and absence of the site (198/140/58 bp), and homozygous for the absence of the site (198 bp), respectively. The frequency of the alleles was C: 0.55 and G: 0.45. The population was in the Hardy-Weinberg equilibrium. *X* values were 1.30 and *P* = 0.52.

**Statistical analysis.** Descriptive results of continuous variables are expressed as mean ± SD. Before statistical analysis, normal distribution and homogeneity of the variables were tested. Parameters that did not fulfill these tests (WBC count, CBG, glycosylated CBG, and insulin sensitivity index) were log-transformed. Comparison of variables between groups of subjects was performed using the Student's *t* test.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Grant SAF 98-0130.

REFERENCES

1. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D: NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40:1286-1292, 1997
2. Pickup JC, Crook MA: Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41:1241-1248, 1998
3. Jonsson A, Wales JK: Blood glycoprotein levels in diabetes mellitus. *Diabetologia* 12:245-250, 1976
4. McMillan DE: Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes. *Metabolism* 38:1042-1046, 1989
5. Gabay C, Kushner I: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340:448-454, 1999
6. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P: The effect of novel polymorphisms in the interleukin 6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369-1376, 1998
7. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW: Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-α, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196-4200, 1997
8. Orban Z, Remaley A, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP: The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2126-2133, 1999
9. Makino T, Noguchi Y, Yoshikawa T, Doi C, Nomura K: Circulating interleukin 6 concentrations and insulin resistance in patients with cancer. *Br J Surg* 85:1658-1662, 1998
10. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Toniatti C, Puccetti P, Bistoni F, Poli V: Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin-6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 183:1345-1355, 1996
11. Xing Z, Gaudie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei X-F, Achong MK: IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101:311-320, 1998
12. Facchini F, Hollenbeck CB, Chen YN, Chen YD, Reaven HM: Demonstration of a relationship between white blood cell count, insulin resistance, and several risk factors for coronary heart disease in women. *J Intern Med* 232:267-272, 1992
13. Targher G, Seidell JC, Tonoli M, Muggeo M, De Sandre G, Goliqi M: The white blood cell count: its relationship to plasma insulin and other cardiovascular risk factors in healthy male individuals. *J Intern Med* 239:435-441, 1996
14. Kishimoto T, Akira S, Taga T: Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 258:593-597, 1992
15. Van Dijk W, Mackiewicz A: Interleukin-6-type cytokine-induced changes in acute phase protein glycosylation. *Ann N Y Acad Sci* 762:319-330, 1995
16. Vranckx R, Savu L, Maya M, Nunez EA: Alpha-fetoprotein and transcortin behave as acute phase reactants in the maternal and fetal compartments of the inflammatory pregnant mouse. *Endocrinology* 120:1782-1789, 1987
17. Bowcock AM, Kidd JR, Lathrop GM, Daneshvar L, May LT, Ray A, Sehgal PB, Kidd KK, Cavalli Sforza LL: The human "interferon-beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics* 3:8-16, 1988
18. Fernández-Real JM, Ricart W: Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia* 42:1367-1374, 1999
19. Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, Richart C: Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 47:1757-1762, 1998
20. Pugeat M, Bonneton A, Perrot D, Rocle-Nicolas B, Lejeune H, Grenot C, Dechaud H, Brebant C, Motin J, Cuilleron CY: Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. *Clin Chem* 35:1675-1679, 1989

**ESTUDI 4.**

**INTERLEKIN-6 GENE POLYMORPHISM AND LIPID ABNORMALITIES IN  
HEALTHY SUBJECTS. J Clin Endocrinol Metab 85:1334-39, 2000.**

## Interleukin-6 Gene Polymorphism and Lipid Abnormalities in Healthy Subjects

JOSÉ-MANUEL FERNÁNDEZ-REAL, MONTSERRAT BROCH, JOAN VENDRELL,  
CRISTÓBAL RICHART, AND WIFREDO RICART

Unitat de Diabetologia, Endocrinologia i Nutricio, University Hospital of Girona "Dr Josep Trueta,"  
17007 Girona; and Unitat d'Endocrinologia, Hospital of Tarragona "Joan XXIII," Facultat Medicina,  
Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

### ABSTRACT

Several lines of evidence indicate that interleukin-6 (IL-6) is involved not only in the hepatic acute phase response but also in adipose tissue metabolism, lipoprotein lipase activity, and hepatic triglyceride secretion. A polymorphism in the *IL-6* gene, associated with differences in IL-6 transcription rate, has been recently described. We aimed to study whether this *IL-6* gene polymorphism leads to differences in fasting and postglucose load plasma lipids in healthy subjects. Subjects with G at position -174 of the *IL-6* gene were similar in age, sex, body mass index, and waist to hip ratio in comparison with carriers of the C allele. However, G carriers showed almost twice plasma triglycerides ( $1.5 \pm 0.9$  vs.  $0.90 \pm 0.37$  mmol/L;  $P = 0.01$ ), very low-density lipoprotein (VLDL)-triglycerides ( $0.97 \pm 0.69$  vs.  $0.42 \pm 0.2$  mmol/L;  $P = 0.002$ ), higher fasting ( $881$  vs.  $458$   $\mu$ mol/L;  $P = 0.01$ ), and postglucose load free fatty acids ( $299$  vs.  $90.5$   $\mu$ mol/L;  $P = 0.03$ ), slightly lower high-density lipoprotein-2 cholesterol ( $0.25 \pm 0.14$  vs.

$0.39 \pm 0.26$  mmol/L;  $P = 0.058$ ), and similar cholesterol and LDL-cholesterol levels than carriers of the C allele. Serum IL-6 levels correlated positively with fasting triglycerides, VLDL-triglycerides, and postload free fatty acids ( $r = 0.61, 0.65$  and  $0.60$ , respectively;  $P < 0.001$ ) and negatively with high-density lipoprotein-cholesterol ( $r = -0.42, P < 0.05$ ). A tendency toward higher serum IL-6 levels was observed among G carriers ( $9.9 \pm 6.9$  vs.  $6.85 \pm 1.7$  pg/mL;  $P = 0.09$ ). The -174G construct was recently reported to show higher expression of IL-6 in *He La* cells and was associated with higher plasma IL-6 levels than the -174C allele. Thus, the results of the present study suggest that subjects with the G allele, associated to higher IL-6 secretion, are prone to lipid abnormalities. Whether this polymorphism contributes to lipid alterations associated with other metabolic disorders awaits additional studies. (*J Clin Endocrinol Metab* 85: 1334-1339, 2000)

INTERLEUKIN (IL)-6 is a multifunctional cytokine produced by many different cell types, including immune cells, endothelial cells, fibroblasts, myocytes, and adipose tissue, mediating inflammatory as well as stress-induced responses (1-4). Recent investigations have shown that locally produced cytokines possess important auto-/paracrine properties that influence diverse functions of the adipose tissue (1-3), in addition to possible effects on other tissues. In this sense, IL-6 has been hypothesized to be responsible for the lipid abnormalities occurring in subjects with the insulin-resistance syndrome (5). This hypothesis is based on the findings of increased blood concentrations of markers of the acute phase response, including C-reactive protein and cortisol in parallel with dyslipidemia (decreased plasma high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and increased plasma triglyceride concentration) in patients with this syndrome (5).

IL-6 inhibits adipocyte lipoprotein lipase activity (6) and induces increases in hepatic triglyceride secretion (7) in rats. In man, the action of IL-6 is also associated with increased plasma free fatty acids (FFAs) (8). Given the pathophysiological role of IL-6 on lipid metabolism, it is plausible to

hypothesize alterations in plasma lipid levels attributed to genetic differences in IL-6 transcription rate.

Recently, a polymorphism in the 5' flanking region of the *IL-6* gene (at position -174) has been reported in which the transcriptional response to stimuli such as endotoxin and IL-1 is altered (9). Specifically, subjects with the G allele showed higher plasma IL-6 levels compared with carriers of the C allele (9).

Given the higher IL-6 levels found in patients with lipid abnormalities of the insulin-resistance syndrome and the possible role of IL-6 in FFA and triglyceride metabolism, we aimed to study the IL-6 G/C polymorphism in relation with fasting and postglucose load FFA levels and fasting plasma lipids.

### Subjects and Methods

#### Study population

**Subjects.** Thirty-two healthy subjects (17 women) were included in this study. All subjects were of Caucasian origin. Inclusion criteria were: 1) body mass index (BMI; weight in kilograms divided by the square of height in meters)  $< 40$  kg/m<sup>2</sup>; 2) absence of any systemic disease; and 3) absence of any infections in the previous month. All subjects reported that their body weight had been stable for at least 3 months before the study, and all were normotensive (the latter data not shown). None of the subjects were taking any medication (including glucocorticoids or estrogens) or had any evidence of metabolic disease other than obesity. Liver disease and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical workup. All women had regular menstrual cycles. The protocol was approved by the Hospital Ethics Committee, and informed consent was obtained from each subject.

Received September 13, 1999. Revision received December 11, 1999.  
Accepted January 10, 2000.

Address correspondence and requests for reprints to: J. M. Fernandez-Real, M.D., Ph.D., Unitat de Diabetologia, Endocrinologia i Nutricio, University Hospital of Girona "Dr Josep Trueta," Carretera de França s/n, 17007 Girona, Spain. E-mail: endocrino@htrueta.scs.es.

IL-6 GENE AND LIPID ABNORMALITIES

1335

Procedures

Anthropometric measurements included BMI and waist to hip ratio (WHR). The subjects' waist was measured with a soft tape midway between the lowest rib and the iliac crest. The hip circumference was measured at the widest part of the gluteal region.

The FFA suppression after oral glucose was evaluated in 20 of these subjects. These subjects were required to consume a weight-maintaining diet containing at least 300 g carbohydrate per day and refrained from exertion for 3 days before the study. The subjects also abstained from caffeine and alcohol for 72 h before the test. An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed according to recent recommendations (10). After a 12-h overnight fast, glucose was ingested in a dose of 75 g, and blood samples were collected through a venous catheter from an antecubital vein at 0, 30, 60, 90, and 120 min for measurement of serum glucose. FFAs were determined in the fasting state and 120 min after the OGTT. [smh3]Analytical methods. The serum glucose level was measured in duplicate by the glucose oxidase method, with a coefficient of variation below 2%. Serum insulin was measured using a monoclonal immunoradiometric assay (Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). Serum IL-6 was measured using a commercial immunoassay (MEDGENIX IL-6 EASIA; Biosource Technologies, Inc., Europe S.A., Zoning Industriel B-6220, Fleunes, Belgium).

FFA levels were measured enzymatically (bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France), with oleic acid as standard. Total serum cholesterol was measured through the reaction of cholesterol esterase/cholesterol oxidase/peroxidase (11). Very low-density lipoprotein (VLDL)-cholesterol was measured after ultracentrifugation at 45,000 × g, which was performed using an ultracentrifuge Beckman Coulter, Inc. XL-70, with a rotor 50.4 Ti. HDL cholesterol was quantified after precipitation with polyethylene glycol at room temperature (12). Total serum triglycerides were measured through the reaction of glycerol-phosphate-oxidase and peroxidase (13). VLDL triglycerides were measured after ultracentrifugation at 45,000 × g. LDL-cholesterol was calculated as total cholesterol - (VLDL-cholesterol + HDL-cholesterol).

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-IL-6 gene analysis

DNA was extracted from cellular blood components by the salting-out method. The PCR was used to detect the IL-6 SfaNI RFLP. The SfaNI polymorphism is due to a replacement of G by C at position 174, and primers were designed to amplify the promoter region of IL-6 gene. The primers used in the PCR were: 5' TGACTTCAGCTTACTCTTTGT 3' and 5' CTGATTGGAAACCTTATTAAG 3'. The reaction was carried out in a final volume of 50 mL containing 1.5 mmol/L of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L each dNTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 0.2 mmol/L each primer, and 2.5 U Taq polymerase (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). DNA was amplified during 35 cycles with an initial denaturation of 10 min at 94 C and a final extension of 10 min at 72 C. The cycle program consisted of a 1-min denaturation at 94 C, a 1-min, 35-sec annealing at 55 C, and a 1-min extension at 72 C. PCR products were digested with SfaNI restriction enzyme at 37 C overnight and electrophoresed on a 2% agarose gel. SfaNI RFLP was detected by ethidium bromide staining.

The identified genotypes were named according to the presence or absence of the enzyme restriction sites, so SfaNI (G/G), (G/C), and (C/C) are homozygotes for the presence of the site (140/58 bp), heterozygotes for the presence and absence of the site (198/140/58 bp), and homozygotes for the absence of the site (198 bp), respectively. The frequency of the alleles was C: 0.55, G: 0.45. The population was in Hardy-Weinberg equilibrium. X values were 1.30 and P = 0.52.

Statistical analysis. Descriptive results of continuous variables are expressed as mean ± sd. Before statistical analysis, normal distribution and homogeneity of the variances were tested. Parameters that did not fulfill these tests (HDL-2 cholesterol, triglycerides, VLDL-triglycerides, FFA) were log-transformed. We used χ<sup>2</sup> test for comparisons of proportions. Comparison of variables between groups of subjects was performed using Student's t test. Relationships between variables were also sought by stepwise multivariate linear regression analysis with forward selection. Levels of statistical significance were set at P < 0.05.

TABLE 1. Anthropometric and biochemical variables of the study subjects

Variable	C/C	G/C and GG	P
Number	11	21	-
Men/women	5/6	10/11	NS
Age (yr)	36.8 ± 8.6	37.5 ± 6.7	NS
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	27.7 ± 5.9	28.9 ± 5	NS
WHR			
Men	0.98 ± 0.03	1.00 ± 0.05	NS
Women	0.89 ± 0.06	0.88 ± 0.07	NS
Fasting glucose (mmol/L)	4.93 ± 0.43	5.46 ± 0.99	NS
Fasting insulin (mU/L)	8.2 ± 2.8	12.7 ± 7.7	0.02
Cholesterol (mmol/L)	4.62 ± 0.24	5.18 ± 0.66	NS
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.5 ± 0.83	3.48 ± 1.05	NS
VLDL-cholesterol (mmol/L)	0.26 ± 0.14	0.43 ± 0.37	NS
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.36 ± 0.41	1.13 ± 0.31	NS
			(0.08)
HDL-2-cholesterol (mmol/L)	0.39 ± 0.26	0.25 ± 0.14	0.058
HDL-3-cholesterol (mmol/L)	0.97 ± 0.19	0.87 ± 0.2	NS
Fasting triglycerides (mmol/L)	0.90 ± 0.37	1.50 ± 0.90	0.012
VLDL-triglycerides (mmol/L)	0.42 ± 0.2	0.97 ± 0.69	0.002
Fasting FFA (μmol/L)	458 ± 132	881 ± 518	0.012
Post-OGTT FFA (μmol/L)	90.5 ± 63	299 ± 107	0.03
(n = 20)			
Serum IL-6 (pg/mL)	6.8 ± 1.7	9.9 ± 6.9	0.09

NS, Not significant.

Results

Anthropometric and biochemical characteristics of the subjects at the time of entry into the study are shown in Table 1. The subjects were divided into two groups on the basis of the IL-6 genotype. Twenty-one subjects had a G at position -174 of the IL-6 gene, 13 heterozygotes (C/G) and 8 homozygotes (G/G). Eleven subjects were homozygotes for the presence of C at this position.

Subjects carrying the G allele, associated to higher plasma levels of IL-6 in a recent study (9), were similar in age, sex, BMI, and WHR in comparison with carriers of the C allele (Table 1). The subjects with the G allele showed significantly higher serum insulin, total and VLDL-triglycerides (Fig. 1), and a tendency toward lower HDL-2 cholesterol than carriers of the C allele (Table 1). Plasma FFA levels were higher in subjects with the G allele in whom a significant gene dosage effect was observed (Fig. 2). These levels remained higher after oral glucose load (Table 1). No significant differences were observed concerning total and LDL-cholesterol or VLDL-cholesterol.

A tendency toward higher serum IL-6 levels was observed among G carriers (9.9 ± 6.9 vs. 6.85 ± 1.7 pg/mL; P = 0.09). Serum IL-6 levels correlated positively with fasting triglycerides, VLDL-triglycerides (Fig. 3), postload FFAs (r = 0.61, 0.65 and 0.60, respectively; P < 0.001) and negatively with HDL-cholesterol (r = -0.42, P < 0.05). In a multiple linear Regression in a stepwise manner to predict serum triglyceride levels, with BMI, WHR, fasting insulin, and IL-6 levels as independent variables, only IL-6 levels (P = 0.0012) and WHR (P = 0.01) were significantly associated with serum triglycerides contributing to 50% of their variance.

Discussion

It has been previously demonstrated that cytokines have profound effects on lipid metabolism, leading to hyperlip-



**Fasting  
 Plasma  
 Triglycerides  
 (mmol/l)**

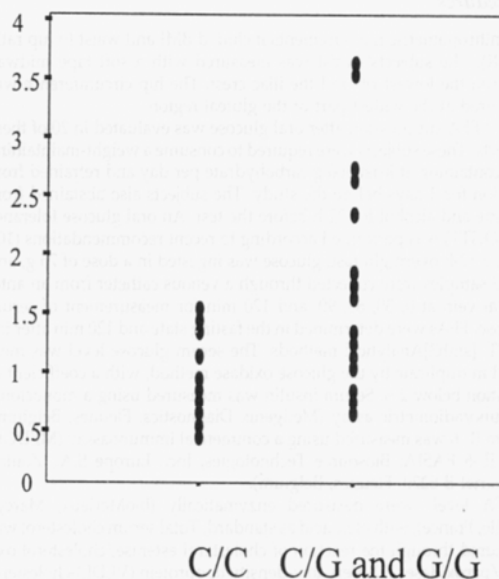
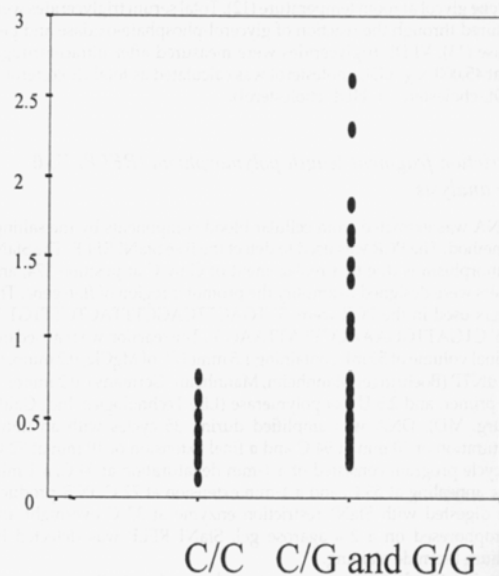


FIG. 1. Individual plasma fasting triglycerides and VLDL-triglycerides according to the IL-6 genotype.

**Fasting  
 Plasma  
 VLDL-  
 Triglycerides  
 (mmol/l)**



**IL-6 allele polymorphism**

idemia (14). Here, we describe that a polymorphism of the *IL-6* gene at position -174 is associated with fasting and postload FFA levels and with fasting VLDL and total triglycerides. When comparing constructs of the 5' flanking region of *IL-6* in a luciferase reporter vector transiently transfected into *He La* cells, the -174 G construct showed higher expression than the -174 C construct (9). This different transcription rate was supported by the *in vivo* observation

that *IL-6* levels were higher in control subjects with the G allele (9).

In our study, the subjects with the G allele showed a tendency toward higher serum *IL-6* levels. In fact, the six subjects with the highest serum *IL-6* levels had the G allele. Interestingly, serum *IL-6* levels correlated with postload FFAs and with fasting VLDL and total triglycerides. The latter association persisted after controlling for BMI and in-

IL-6 GENE AND LIPID ABNORMALITIES

1337

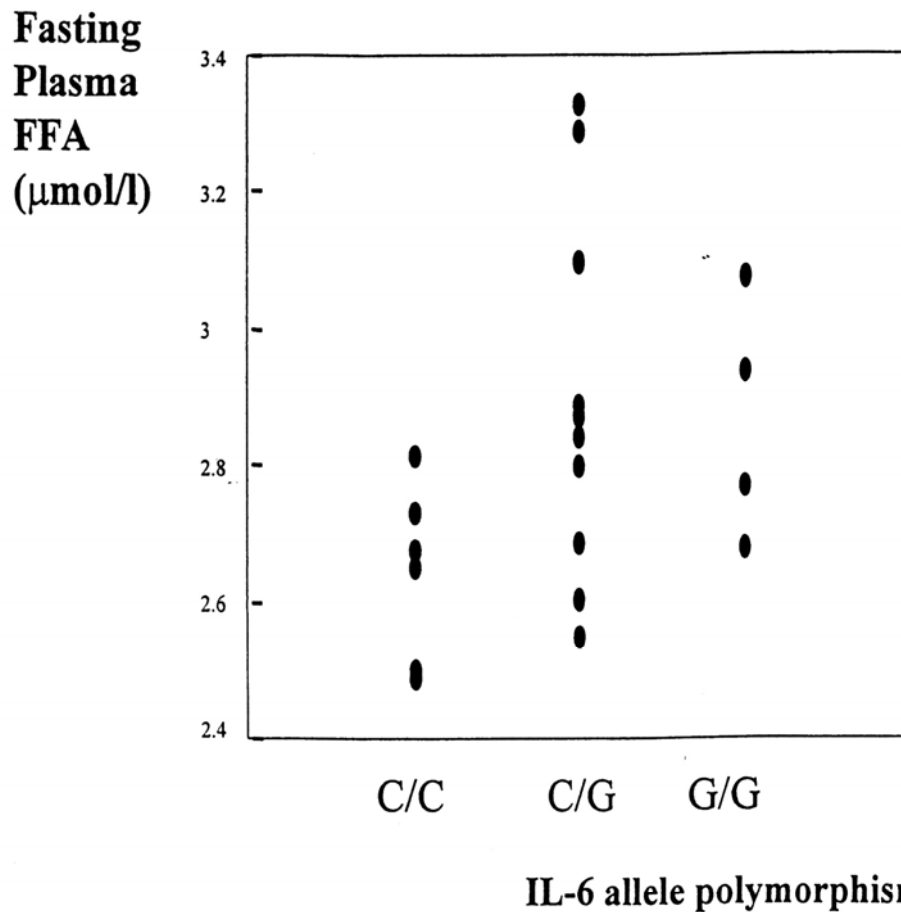


FIG. 2. Individual fasting FFAs according to the IL-6 genotype (note the log scale).

sulin levels. It should be kept in mind, however, that the circulating cytokine molecules are seldom found in the unbound state. They are almost always bound to binding or carriers proteins, autoantibodies, and soluble receptors. The usual sandwich-format immunoassays recover free, and some predictably bound cytokine, but misses other cytokine bound by unpredictable binding entities.

Higher IL-6 levels have been described in association with raised plasma triglyceride concentration in epidemiological studies in men with different cardiovascular risk factors (15) and with relatively high plasma triglycerides and low HDL-cholesterol in healthy centenarians (16). Together with our findings, it seems that those individuals with a genetic predisposition to higher IL-6 secretion (*i.e.* those with the G allele) are prone to develop higher total and VLDL-triglycerides, higher plasma FFA, and lower HDL2-cholesterol than subjects carriers of the C allele. In fact, the latter subjects displayed a tightly regulated plasma triglyceride and FFA concentration, as shown in Figs. 1 and 2. In recent studies, it has been shown that IL-6 induces physiological changes reminiscent of the catabolic state, which include increased resting energy expenditure and increases in plasma FFA. Specifically, infusions of recombinant human IL-6 in humans in-

duced a 60% increase in plasma FFA concentration and a 105% increase in FFA rate of appearance in plasma (8). These effects in humans might be due to the IL-6' effects on adipocyte lipoprotein lipase activity (6) or hepatic triglyceride secretion (7) as observed in rats.

Cytokines operate both as a cascade and as a network and can regulate the production of other cytokines and cytokine receptors. In this sense, perhaps the increased production of IL-6 is merely reflecting the actions of other cytokines more closely involved in lipid abnormalities, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Administration of TNF- $\alpha$  to humans increases serum triglyceride levels by stimulating hepatic triglyceride synthesis and secretion (17). In a recent study, plasma TNF- $\alpha$  concentration positively correlated with VLDL triglycerides and negatively with HDL cholesterol in postinfarction patients (18). We have recently described a significant correlation between plasma levels of the soluble fraction of TNF- $\alpha$  and total triglycerides and HDL2 cholesterol (19). However, in contrast to what occurs with IL-6, genetic polymorphisms of TNF- $\alpha$  do not contribute to significant differences in plasma lipid concentration (20).

In addition to lipid abnormalities, IL-6 contributes to atherogenesis in several other ways, such as by inducing

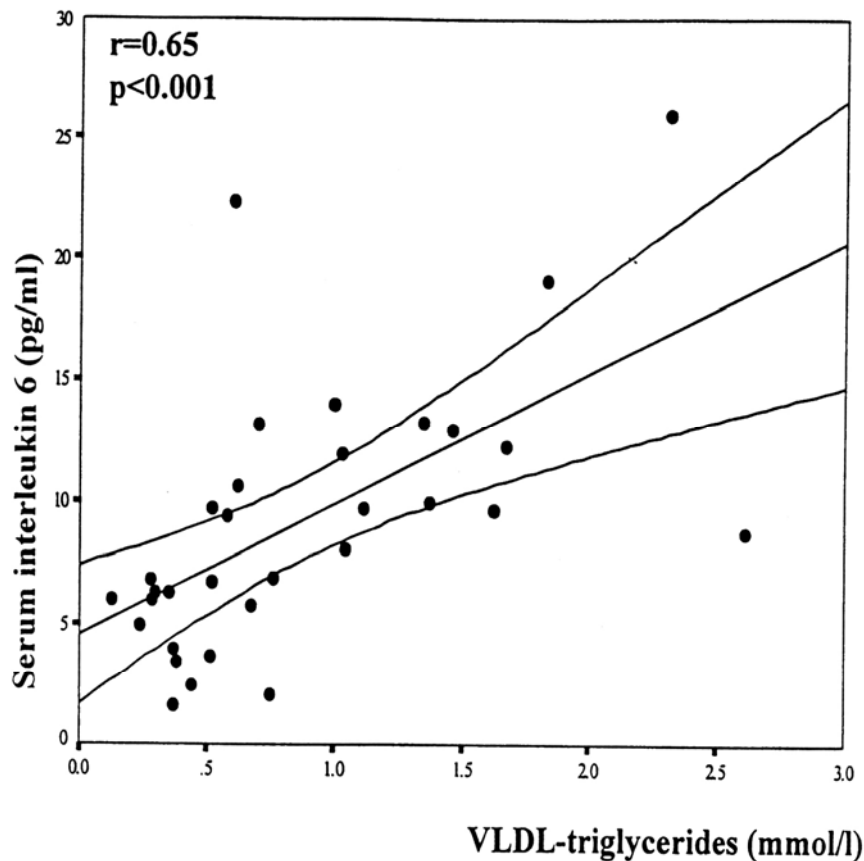


FIG. 3. Linear correlation between VLDL-triglycerides and serum IL-6 levels in the study subjects.

adhesion molecules and increasing endothelial permeability. Higher circulating levels of IL-6 and C-reactive protein have been recently associated with mortality in healthy older persons (21). It cannot be excluded that hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol constitute confounding factors of this association (15, 16).

One limitation of this study is the small number of subjects. The size of the study has led possibly to potential type II errors (for example, HDL cholesterol would be significantly decreased if more subjects were studied). However, our subjects have been studied not only in fasting conditions, but also dynamically, after an oral glucose load, showing the blunted suppression of FFA. All the different measurements (fasting triglycerides, VLDL-triglycerides, basal and post-load FFA) concur with the hypothesis that those individuals with the "higher cytokine responder genotype" display more probably lipid abnormalities.

In summary, a polymorphism of the *IL-6* gene determines differences in plasma total and VLDL-triglycerides and in fasting and postglucose load FFA levels. In evolutionary terms, these findings are in agreement with the hypothesis that genetical predisposition to inflammation could be beneficial in the response to starvation and injury for our ancestors, providing substrates for brain metabolism, but this advantage is lost with westernization (22).

#### References

- Orban Z, Remaley A, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP. 1999 The differential effect of food intake and  $\beta$ -adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:2126-2133.
- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. 1998 Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:847-850.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al. 1997 Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:4196-4200.
- Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. 1998 The pathophysiological roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med.* 128:127-137.
- Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. 1997 NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia.* 40:1286-1292.
- Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. 1992 Interleukin-6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice *in vivo* and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin-6 in cancer cachexia. *Cancer Res.* 52:4113-4116.
- Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C. 1995 Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology.* 136:2143-2149.
- Stouthard JM, Romijn JA, Van der Poll T, et al. 1995 Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. *Am J Physiol.* 268:E813-E819.
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. 1998 The effect of novel polymorphisms in the interleukin 6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 102:1369-1376.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997 Report of The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 20:1183-1197.

IL-6 GENE AND LIPID ABNORMALITIES

1339

11. Siedel J, Hagele EO, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. 1983 Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem.* 29:1075-1080.
12. Kostner GM, Molinari E, Pichler P. 1985 Evaluation of a new HDL2/HDL3 quantitation method based on precipitation with polyethylene glycol. *Clin Chim Acta.* 148:139-147.
13. Wahlefeld AW. 1974 Lipoproteins. In: Bergmeyer HU, ed. *Methoden der enzymatischen analyse*, 3rd ed., vol II. Weinheim: Verlag Chemie; 187-188.
14. Grunfeld C, Feingold KR. 1992 Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes.* 41(Suppl 2):97-101.
15. Mendall MA, Patel P, Asante M, et al. 1997 Relation of serum cytokine concentration to cardiovascular risk factors and coronary artery disease. *Heart.* 78:273-277.
16. Baggio G, Donazzan S, Monti D, et al. 1998 Lipoprotein(a) and lipoprotein profile in healthy centenarians: a reappraisal of vascular risk factors. *FASEB J.* 12:433-437.
17. Stames Jr HH, Warren RS, Jeevsnadern M, et al. 1988 Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to injury in man. *J Clin Invest.* 82:1321-1325.
18. Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, et al. 1998 Evidence for a role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metabolism.* 47:113-118.
19. Fernández-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Castiñeira MJ, Vendrell J, Ricart W. 1999 Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 are independent determinants of plasma cholesterol and LDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Atherosclerosis.* 146:321-327.
20. Fernández-Real JM, Gutiérrez C, Ricart W, et al. 1997 The TNF- $\alpha$  gene NcoI polymorphism influences the relationship among insulin resistance, Percent body fat and increased serum leptin levels. *Diabetes.* 46:1468-1472.
21. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, et al. 1999 Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med.* 106:506-512.
22. Fernández-Real JM, Ricart W. 1999 Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia.* 42:1367-1374.

## **5. DISCUSSIÓ**

## 5.1. ESTUDI 1

### **PLASMA LEVELS OF THE SOLUBLE FRACTION OF TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 2 AND INSULIN RESISTANCE. *Diabetes* 47:1757-1762, 1998.**

En aquest primer treball s'estudia el paper que desenvolupa el sistema TNF $\alpha$  per mitjà dels seus receptors de membrana en la resistència a la insulina estudiada "in vivo", en una població amb un grau d'obesitat moderada. La base d'aquest estudi es fonamenta en un treball previ del grup d'Hotamisligil GS, ja comentat a la introducció (*Hotamisligil GS, 1997*). En aquest treball es demostrava que l'expressió dels dos receptors de membrana del TNF $\alpha$  (TNFR1 i TNFR2) es trobava clarament diferenciada en relació amb el teixit adipós. Així, els nivells de mRNA de TNFR2 eren molt més abundants en el teixit adipós de dones amb un grau d'obesitat severa, i aquesta expressió es correlacionava fortament amb els nivells plasmàtics de la fracció soluble del mateix receptor (sTNFR2). En aquest sentit, el nostre treball va mostrar resultats coherents en aquesta línia, els individus obesos presentaven nivells d'sTNFR2 més alts que els no obesos, a diferència dels sTNFR1, que eren similars. A més a més, vàrem constatar una clara correlació entre els nivells plasmàtics del receptor 2 (sTNFR2) i la resistència a la insulina ( $r= 0.38$ ,  $p=0.02$ ), analitzada per mitjà del test de tolerància intravenosa a la glucosa amb mostreig freqüent (test del model mínim) (figura 3).

Un altre aspecte interessant que vàrem poder confirmar en el nostre treball va ser la intensa relació que hi ha entre els nivells plasmàtics del receptor 2 del TNF $\alpha$  amb el sexe i el grau d'obesitat de la població estudiada. L'estudi global entre homes i dones, va permetre observar uns nivells superiors d'ambdues fraccions solubles de receptors en el grup dels homes. En distribuir els subjectes segons la presència /absència d'obesitat, vàrem poder constatar una major resistència a la insulina en els homes, junt amb uns nivells d'sTNFR2 més elevats respecte a les seves homòlogues de sexe contrari. Aquestes diferències, en canvi, no es van observar en els nivells plasmàtics d'sTNFR1.

És obvi que la composició corporal dels dos sexes és clarament diferent i que podria intervenir en les troballes comentades, sobretot si tenim en compte la diferent expressió al teixit adipós de TNFR2 respecte TNFR1 comentada anteriorment. En aquest

sentit van poder constatar una relació directa entre els nivells d'sTNFR2 i dos marcadors de la composició corporal com són el BMI i la WHR. De fet, aquesta relació amb la WHR ja havia estat descrita en l'estudi d'Hotamisligil en població amb obesitat severa (*Hotamisligil GS, 1997*). És conegut que aquests dos paràmetres són predictors independents de la sensibilitat a la insulina, i especialment, la raó cintura maluc, que proporciona una mesura de l'obesitat d'origen abdominal. Aquest tipus d'obesitat, també anomenada obesitat central o intra-abdominal, presenta una elevada correlació amb el risc cardiovascular i amb l'aparició de la DM2, a causa de, fonamentalment, la seva associació amb la resistència a la insulina (*Lemieux S, 1996*) i (*Kissebah AH 1994*).

En els subjectes del nostre treball, les sTNFR2 es correlacionen també amb la glicèmia basal i la glicèmia després de la sobrecàrrega oral de glucosa, cosa que suggereix que aquest receptor podria estar regulat en l'obesitat per uns mecanismes de senyals comuns amb la glucosa. De fet, treballs previs ja van donar a conèixer que l'expressió del TNF $\alpha$  era directament dependent dels nivells d'hiperinsulinèmia (*Hotamisligil GS, 1995*), així com de la disponibilitat perifèrica de glucosa determinada pel clamp euglucèmic (*Saghizadeh M, 1996*). Això suposaria que l'activitat major del TNF $\alpha$  observada en situacions de RI, com pot ser l'obesitat i la pròpia DM2 s'acompanyaria d'una síntesi major per part del teixit adipós de les seves fraccions solubles; això contribuiria a una més gran resistència a la insulina, com sembla que indiquen els resultats dels nostre treball, sobretot en relació amb el TNFR2. Ja era conegut el fet que l'expressió del TNFR2 es trobi associada a un major grau d'adipositat abdominal (*Hotamisligil GS, 1997*), la qual s'associa per si mateixa a una major RI. En canvi, nosaltres vàrem poder constatar que de forma independent els nivells d'sTNFR2 eren capaços de predir el grau de RI, fet que el confereix un valor intrínsic en aquest procés.

El fet d'atribuir a les sTNFR una acció potenciadora de l'activitat del TNF $\alpha$  sobre el teixit adipós no deixa de ser un procés especulatiu. Sabem que aquestes fraccions poden actuar de forma diferent en circumstàncies determinades, potenciant l'acció del TNF $\alpha$  o bé tamponant la seva acció en actuar sobre el receptor de membrana i disminuint o inhibint així la seva acció (*Aderka D, 1992*). Intentar discernir si es tracta d'un efecte amplificador de la resposta del TNF $\alpha$  sobre l'adipòcit, o d'un intent de compensar la disfunció

provocada per l'increment en la transcripció del TNF $\alpha$  en aquest tipus cel.lular , és difícil de realitzar amb les dades disponibles.

En relació amb les diferències amb la composició corporal d'ambdós sexes, un altre aspecte interessant observat en el nostre treball, va ser la constatació que els homes que presentaven els nivells de les fraccions solubles més elevats d'ambdós receptors presentaven, així mateix, una menor proporció de teixit adipós amb una major massa muscular (FFM). És conegut que el teixit muscular és un dels òrgans diana més importants d'acció de la insulina, i alhora amb capacitat per sintetitzar el TNF $\alpha$  (*Saghizadeh M, 1996*). La presència d'una major massa muscular, associada a una més gran RI i a uns nivells d'sTNFR2 més alts en els homes, fa pensar en una font accessòria d'sTNFR2 d'origen muscular. Hipotèticament, aquest nivells més elevats d'sTNFR2 provinents del teixit muscular podrien intervenir en l'estabilitat de la forma activa del TNF $\alpha$  (homotrímer de TNF $\alpha$ ), i donar lloc a una prolongació del seus efectes en la cèl.lula adiposa. Evidentment aquesta hipòtesi hauria de ser confirmada mitjançant estudis "in vivo" sobre el teixit muscular, per comprovar una major expressió d'sTNFR2 i el seu efecte sobre l'activitat del TNF $\alpha$ . Són pocs els treballs realitzats en aquest teixit en relació amb l'expressió de TNFR1 i 2; no obstant això, recentment en un grup de pacients amb patologia associada a RI com són els pacients amb HIV amb lipodistròfia els quals han perdut la major part del teixit adipós, es va poder constatar un clar increment d'sTNFR2, altament correlacionat amb la sensibilitat a la insulina de predomini muscular, determinada per mitjà de la tècnica del clamp euglucèmic (*Mynarcik DC, 2000*). Òbviament existeix la possibilitat de la participació d'un component inflamatori responsable de la hiperactivitat del sistema TNF $\alpha$  en aquests pacients, però podria tractar-se d'una font d'sTNFR2 de predomini muscular, cosa que donaria suport a la hipòtesi anteriorment comentada.

En resum, en aquest treball descrivim per primer cop una relació entre l'acció de la insulina i els nivells circulants de les fraccions solubles del receptor 2 del TNF $\alpha$ . Presentem les sTNFR2 com a possibles marcadors de resistència a la insulina mediada per TNF $\alpha$  en l'estat d'obesitat. Com ja hem comentat en la introducció d'aquesta tesi, la mesura dels nivells circulants en TNF $\alpha$  és extremadament difícil i poc informativa a causa



dels nivells baixos i les interferències amb altres proteïnes. En canvi, els nivells d'sTNFRs són més elevats en l'obesitat, són proteïnes més estables i fàcils de mesurar.

## 5.2. ESTUDI 2

### **POLYMORPHISM OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$ RECEPTOR 2 GENE IS ASSOCIATED WITH OBESITY, LEPTIN LEVELS, AND INSULIN RESISTANCE IN YOUNG SUBJECTS AND DIET-TREATED TYPE 2 DIABETIC PATIENTS. *Diabetis Care* 23(6):831-37, 2000.**

Les evidències cada cop més grans de la participació del sistema TNF $\alpha$  en el desenvolupament de la resistència a la insulina, i més concretament en el paper determinat que semblaven tenir els receptors d'aquesta citocina, sobretot els nivells de les fraccions solubles del TNFR2, tal com ja s'ha comentat en el treball anterior, ens va motivar a seguir estudiant el paper del sistema del TNF $\alpha$ , especialment vinculada al receptor 2 de la citocina. Fins aquest moment, sabíem que l'anomenat sistema TNF $\alpha$  mantenia una clara autoregulació, per mitjà del que podríem denominar "feed-back" ultracurt, on intervenia un efector (el TNF $\alpha$ ), dos receptors (R1 i R2) i diversos moduladors entre els que destacaven les fraccions solubles d'ambdós receptors. No obstant això, diversos treballs a finals dels anys 90, van implicar en la complexa red d'activitat del sistema TNF $\alpha$  a una nova hormona, la leptina, sintetitzada principalment per el teixit adipós. Diversos treballs havien conseguit demostrar que tant a nivell d'experimentació animal "in vivo" com en cultius d'adipocits, el TNF $\alpha$  era capaç d'estimular la secreció de leptina i alhora, la pròpia leptina era capaç d'autoregular l'expressió del TNF $\alpha$  (*Grunfeld C, 1996*) i (*Kirchgeßner TG, 1997*). Alhora, era conegut que els nivells de leptina en humans circulaven en estreta correlació tant amb els nivells circulants del TNF $\alpha$  (*Zumbach MS, 1997*) com amb els de les fraccions solubles dels seus receptors (*Mantzoros CS, 1997*). Tot això va portar a la hipòtesi de l'existència de l'anomenat "eix leptina-TNF", especulant sobre la seva possible relació amb el desenvolupament de resistència a la insulina i l'obesitat.

Aquesta nova prespectiva va fer que el nostre grup es plantegés l'estudi de la relació entre aquestes adipoquines des del punt de vista serològic i genètic, sota la hipòtesi ja comentada anteriorment, d'un possible paper regulador del gen del TNFR2 sobre l'eix TNF $\alpha$ -leptina. L'abordatge tècnic per analitzar el gen del TNFR2 en la seva totalitat era

complicat i per això en aquesta primera aproximació a l'estudi de possibles mutacions en aquest gen, ens vàrem proposar avaluar una regió on previament un grup havia descrit l'existència de variacions en la seqüència que podien ser importants en l'estabilitat del mRNA i que es trobava situada en l'extrem 3' del gen, en la regió no traduïda (3'UTR) (*Kaufman BA, 1993*).

La descripció previa de les variacions descrites en aquesta regió per Kaufman BA es mostrava confusa en alguns aspectes ja que no hi havia una definició clara de les bases mutades responsables de les diferents variants descrites. Aquest estudi s'havia realitzat per la tècnica denominada SSCP. Aquesta tècnica es basa en la diferent mobilitat electroforètica del DNA de cadena única, cosa que permet una ràpid rastreig de possibles mutacions que variïn aquesta mobilitat. No obstant això, aquesta tècnica no ofereix informació sobre la mutació que existeix, només serveix per identificar de forma qualitativa la seva possible existència. En el nostre cas, es van observar 3 patrons de bandes diferents, que després de la seva seqüenciació, es varen assignar a quatre variants al·lèliques anomenades A1-A4. En totes elles, variacions en tres nucleòtids en les posicions 593, 598 i 620 determinaven les quatre variants nombrades. Les variants A3 i A4 presentaven la mateixa mobilitat electroforètica i només es van diferenciar per seqüenciació directa.

En l'estudi per genotips extesos vàrem observar una tendència entre els homozigots per l'al·lel A2 a presentar nivells circulants de leptina més alts i un BMI major. La baixa freqüència dels al·lells A3 i A4, i per tal de facilitar l'estudi, vàrem decidir agrupar-los amb l'al·lel A1 en un mateix grup, anomenat al text grup no-A2 (absència de l'al·lel A2). La resta el formaven els portadors de l'al·lel A2. La distribució genotípica i al·lèlica de la població sana no va mostrar diferències significatives respecte a les observades entre els pacients amb DM2 (taula1).

Un altre cop, en aquest estudi vàrem poder constatar un clar efecte del sexe i l'edat sobre els resultats obtinguts. Així els individus més joves (edat inferior a la mitjana global del grup) mostraven un BMI i uns nivells circulants de leptina significativament més alts entre els portadors de l'al·lel A2, respecte als no-A2. Aquestes diferències eren a més a més degudes a les dones portadores d'aquest al·lel. Aquest resultat eren també reproduïbles en la població amb DM2, però, només entre els pacients que no rebien

fàrmacs hipoglucemians o insulina pel tractament de la diabetis (figura 1). Pensem que les possibles diferències existents i que no observem en aquest subgrup d'individus tractats amb hipoglucemians podrien haver quedat emmascarades pel pròpi tractament amb els hipoglucemians, o bé per l'hiperinsulinisme ja sigui per l'exògen, induït per la insulina subcutània o bé pel produït per l'estímul sobre la cèl·lula beta pancreàtica dels hipoglucemians orals. Així doncs, a la nostra població motiu d'estudi, la variant A2 del gen del receptor 2 del TNF $\alpha$  sembla influir en la regulació de l'adipocitat i els nivells circulants de leptina, tant en els individus sans com en pacients amb DM2.

Davant aquesta observació, cabria esperar de forma lògica una major prevalència de l'al·lel A2 entre els subjectes amb DM2, que com sabem presenten un major BMI i nivells més elevats de leptina que la població sana (*Moller N, 1998*) i (*Paolisso G, 1998*). No obstant això, no vàrem poder constatar aquest esperat augment de la freqüència de l'al·lel A2. És difícil trobar una única i convenient explicació per aquesta observació. Hem de tenir en compte, però, que la diabetis tipus 2 és una malaltia heterogènia amb múltiples factors que poden afectar de manera diversa a les variables que estudiem, molt difícils de controlar amb el tipus de disseny d'aquest estudi. La presència d'obesitat, els diferents tractaments utilitzats, la coexistència d'altres malalties derivades de la pròpia diabetis, el temps d'evolució de la diabetis, etc, són factors que només des d'un estudi prospectiu poden ser controlats correctament.

La troballa d'una associació entre els nivells de leptina circulants, el grau d'obesitat i aquesta regió genètica, ens fa intentar buscar una base fisiopatològica que intenti explicar les observacions descrites. La participació de la regió no traduïda del gen en el processament correcte del mRNA, podria conferir a les variants observades una eficiència diferent en el procés. No obstant això, aquesta hipòtesi no deixa de ser una especulació no demostrable amb les dades disponibles d'aquest treball, i es necessiten d'estudis "in vitro" que determinin la variació en la transcripció i estabilitat del mRNA en diferents grups cel·lulars. Un altra possible explicació a l'associació observada, seria l'existència de marcadors genètics situats a prop del locus del gen del TNFR2 i que es trobessin en desequilibri de lligament. En aquest sentit, alguns treballs sobre marcadors genètics susceptibles a conferir obesitat, realitzats en cohorts de famílies, suggerixen "zones calentes" situades des de la regió 1p32 fins a la 1p22 lligades a major BMI, massa grassa i

insulinèmia basal (*Chagnon YC, 1997 i 1998*). Com es recordarà, esta zona es troba a prop d'on s'ubica el gen del TNFR2 i per tant podria tractar-se d'un marcador d'altres locus susceptibles lligats al gen del TNFR2.

Com recordarem les dades del nostre treball demostren que els portadors de l'al·lel A2 presentaven un major BMI amb major percentatge de massa grassa i nivells circulants més elevats de leptina. Aquesta associació era observada preferentment als individus més joves i fundamentalment en les dones, perdent-se en el grup d'individus de major edat. L'edat és un factor determinat en el manteniment de la regulació de "l'eix leptina-TNF $\alpha$ " (*Qian H, 1998*), i sabem que entre la població d'edat avançada la pèrdua de la relació entre la grassa corporal i la leptina, es tradueix en un major BMI i una menor pèrdua de pes (*Moller N, 1998*). La nostra hipòtesi, sobre la base de les observacions d'aquest estudi implicaria als subjectes portadors de l'al·lel A2 sobre una possible desregulació del sistema nomenat, afavorint una major activitat del sistema TNF $\alpha$  a nivell paracrí, amb el subsegüent increment de massa grassa i nivells de leptina. El fet de no trobar diferències en els nivells circulants de les fraccions solubles de TNFR2 segons el genotip que hem estudiat, no descarta que de forma subclínica aquesta citocina es pugui trobar de forma desproporcionadament elevada a nivell tissular, amb les conseqüents anomalies metabòliques. Obviament, no podem descartar altres factors de confusió com l'edat, el temps d'evolució de la diabetis, complicacions associades a la diabetes, etc, que poguessin afectar als nivells circulants d'aquests receptors.

Un altre aspecte interessant d'aquest treball, és l'associació observada entre l'al·lel A2 i característiques fenotípiques de la síndrome metabòlica associada a resistència a la insulina. La presència d'un índex cintura-maluc més alt, nivells circulants d'insulina més alts i major resistència a la insulina junt amb l'observació d'hipertrigliceridèmia als individus portadors de l'al·lel A2, dona suport a la participació d'aquest loci genètic a conferir susceptibilitat per al desenvolupament de la síndrome metabòlica. És difícil no obstant, determinar si la resistència a la insulina que presenten els individus portadors de l'al·lel A2 és una causa del fet de ser portador d'aquest al·lel, o bé està traduïnt una conseqüència d'un ambient amb majors nivells de leptina i major BMI. La leptina, és una hormona amb capacitat de millorar la sensibilitat a la insulina, tal com ja s'ha demostrat en models d'animals i més recentment en un brillant estudi realitzat en pacients amb diversos

tipus de lipodistròfia, en els quals l'administració d'aquesta hormona aconseguia millorar les alteracions metabòliques lligades a la síndrome metabòlica que presentaven aquest pacients, reduint de forma important la resistència a la insulina d'aquests pacients. Aquests canvis s'acompanyaven d'una reducció dels nivells de TNF $\alpha$  en plasma, cosa que confirmava l'importància reguladora de "l'eix leptina-TNF $\alpha$ " "in vivo" als humans (*Oral EA, 2002*).

Així doncs, en aquest treball identifiquem la presència de l'al·lel A2 en la regió 3'UTR del gen del TNFR2 que podria predisposar presentar BMI i nivells de leptina més alts així com una menor sensibilitat a la insulina; i per tant confereix al gen del TNFR2 un possible paper en la base genètica de la resistència a la insulina.

### 5.3. ESTUDI 3

#### INTERLEUKIN-6 GENE POLYMORPHISM AND INSULIN SENSITIVITY. *Diabetes* 49:517-20, 2000.

Seguint amb la nostra línia d'investigació sobre citocines proinflamatòries, el nostre grup va ampliar l'estudi d'aquestes hormones a una nova citocina implicada també en la resposta inflamatòria: la IL-6. Així de forma quasi simultània es va estudiar la IL-6, tal com ho havíem fet amb el sistema TNF $\alpha$ , tant a nivell serològic com genètic, en relació amb la seva participació en el metabolisme de la glucosa i en el lipídic. En aquest treball es va avaluar el paper d'una variant genètica situada en la posició - 174G>C en el promotor del gen de la IL-6 sobre la sensibilitat a la insulina en una població sana d'origen caucàsic i mediterrani.

La IL-6, tal com ja s'ha comentat més àmpliament a la introducció, participa en la regulació de la resposta immunològica, en reaccions de fase aguda i en l'hematopoiesi. Els nivells d'aquesta citocina semblen que mantenen una estreta relació amb el metabolisme glucídic, i els seus valors en el fluid intersticial del teixit adipós subcutani durant l'estat pospandrial s'han descrit elevats, paral·lelament amb els nivells circulants de glucosa i insulina (*Orban Z, 1999*). D'altra banda, en estudis amb pacients amb DM2, més concretament amb individus amb components de la síndrome X metabòlica, s'han observat nivells d'IL-6 circulants clarament més elevats (*Pickup JC, 1997, i 1998*)

La variant genètica estudiada en aquest treball havia mostrat en diversos treballs "in vitro" previs una capacitat de modificar la taxa de transcripció del gen de la IL-6. Concretament, els portadors en homozigosi de l'al·lel C eren els que mostraven uns nivells plasmàtics més baixos de la citocina en plasma respecte a la resta de combinacions genètiques (*Fishman D, 1998*). Així, la relació directa observada entre aquesta variant genètica i els nivells plasmàtics d'IL-6 i la participació d'aquesta citocina en els estats en què predomina la resistència a la insulina, com la DM2, ens va fer plantejar la hipòtesi que aquesta mutació podria intervenir en la regulació de la resistència a la insulina en població sana.

En la mostra analitzada vàrem poder observar un 35% d'individus homozigots per a l'al·lel C, al·lel associat amb els nivells circulants d'IL-6 més baixos. Ja que la mostra analitzada total era petita (n= 32), en l'anàlisi de les variables avaluades en aquest estudi, es van definir dos grups de subjectes tenint en compte la presència o absència genotípica de l'al·lel G. D'aquesta manera aconseguíem agrupar els individus amb menor capacitat teòrica de síntesi d'IL-6 (homozigots CC) i la resta d'individus (GG i GC). En aquest sentit vàrem poder observar que els individus homozigots per a l'al·lel C, mostraven nivells d'insulina basal més baixos amb un índex de sensibilitat a la insulina superior a la resta dels individus portadors de l'al·lel G. Així mateix, l'àrea de glucosa sota la corba després d'un test de OGTT, així com els nivells d'hemoglobina glicosidada, van ser significativament més baixos en aquests individus, tot i que presentaven una edat, un BMI i un percentatge de massa grassa similars a la resta dels individus avaluats (taula 1).

En aquest treball no disposem de la determinació directa dels nivells de la IL-6; no obstant això, es va intentar avaluar la seva acció per mitjà de mecanismes indirectes sobre els quals es coneix bé l'acció d'aquesta citocina. Així per exemple, es va observar que en la nostra població els individus amb menor activitat teòrica d'IL-6 mostraven un menor nombre de cèl·lules blanques perifèriques, així com nivells de globulina transportadora de cortisol glicosidada més baixos que els individus portadors de l'al·lel G. Recentment, en uns darrers estudis, el comptatge de les cèl·lules blanques ha estat relacionat amb la sensibilitat a la insulina. En particular, en un treball de Facchini F, aquesta variable es correlacionava significativament amb la disposició de glucosa regulada per insulina en la pràctica del clamp euglucèmic (*Facchini F, 1992*). En un treball posterior demostren que el comptatge de neutròfils i limfòcits es correlaciona positivament amb alguns components de la síndrome de resistència a la insulina i que les concentracions plasmàtiques d'insulina s'associaven específicament amb les dels limfòcits i monòcits (*Targher G, 1996*). Aquestes associacions també es confirmen al nostre estudi, on observem una correlació significativa entre la sensibilitat a la insulina i el comptatge de cèl·lules blanques ( $r = -0.48$ ,  $p = 0.001$ ), el comptatge de neutròfils ( $r = -0.50$ ,  $p = 0.001$ ) i el comptatge de limfòcits ( $r = -0.34$ ,  $p = 0.02$ ).

Ja que la IL-6 intervé la inducció de canvis postranscripcionals en la glicosidació de les proteïnes de fase aguda per mitjà de la unió d'un oligosacàrid (*Van Dijk W, 1995*),



també es va utilitzar la determinació dels nivells de la proteïna transportadora de cortisol i de la seva forma glicosidada com a marcadors indirectes de l'acció de la IL-6. En aquest cas, en el nostre treball els nivells d'aquesta proteïna, tant en la seva forma basal com glicosidada, tendien a ser més alts en el grup dels individus portadors de l'al·lel G comparats amb els no portadors d'aquest al·lel.

Entenem que es tracta d'evidències indirectes d'una suposada acció de la IL-6 ja que, com ja hem comentat, no es van determinar els nivells circulants d'aquesta citocina. No obstant això, hem de tenir en compte que la determinació directa dels nivells d'IL-6 tampoc ofereix un valor real de l'activitat d'aquesta citocina. La seva curta vida mitjana plasmàtica i la seva forma de circulació unida a altres proteïnes, així com al seu propi receptor, fa que els immunoassaigs habituals que hi ha per a la seva determinació no reflecteixin realment l'activitat de la citocina.

Aquests resultats fan pensar en la possibilitat que el polimorfisme -174 de la IL-6, mitjançant la seva diferent taxa de transcripció associada, pugui participar en la predisposició genètica en el desenvolupament de la resistència a la insulina. En la nostra hipòtesi proposada, els individus portadors de l'al·lel G, com a conseqüència de taxes de transcripció del gen més altes, presenten nivells circulants més alts d'IL-6, cosa que és reflecteix en els nivells més alts dels marcadors indirectes de l'acció d'aquesta citocina que hem mesurat. Aquest grup d'individus, per diversos mecanismes encara no aclarits, prodrien presentar predisposició a incrementar els nivells de glucosa i els d'insulina, així com a incrementar marcadors de resposta de fase aguda i a presentar una menor sensibilitat a la insulina.

Els mecanismes pels quals la IL-6 podria induir al desenvolupament de la resistència a la insulina no són coneguts, i són difícils de deduir amb les dades d'aquest treball. La IL-6 és la principal citocina en la regulació de la síntesi de proteïnes de resposta de fase aguda, les quals segons s'ha descrit que es troben augmentades en els pacients amb DM2, sobre tot en aquells amb característiques de la síndrome de resistència a la insulina (*Pickup JC, 1997 i 1998*), (*Jonsson A, 1976*), (*McMillan DE, 1989*), com ja hem comentat. Algunes d'aquestes proteïnes són conegudes inductores de resistència a la insulina, com és el cas del cortisol. De fet, nivells elevats d'aquesta proteïna s'han descrit en pacients amb DM2 amb el síndrome de resistència a la insulina (*Pickup JC, 1997*). La interacció d'unes

citocines amb les altres amb la forma d'activació típica en cascada, amb mecanismes de regulació per mitjà de "feed-back" curts entre elles mateixes, fa difícil atribuir directament a la IL-6 la seva acció sobre la resistència a la insulina. Per això hi ha la possibilitat que les associacions observades no tinguin una relació directa amb la IL-6 i siguin un reflex de l'acció d'una altra citocina que es trobi més directament implicada en el metabolisme de la glucosa i en la sensibilitat a la insulina, i que alhora intervingui en l'acció de la IL-6 com ho podria fer el TNF $\alpha$ .

En resum, en aquest treball descrivim que el polimorfisme -174G>C en el gen de la IL-6 pot influir en la predisposició genètica al grau de resistència a la insulina, ja que podria intervenir sobre els nivells circulants d'insulina i de glucosa i sobre els nivells de proteïnes de reacció de fase aguda.

## 5.4. ESTUDI 4

### INTERLEUKIN-6 GENE POLYMORPHISM AND LIPID ABNORMALITIES IN HEALTHY SUBJECTS. *J Clin Endocrinol Metab* 85(3):1334-39,2000.

Paral·lelament al nostre treball anterior, que semblava que implicava la IL-6 en la participació en el procés de la sensibilitat a la insulina per mitjà dels seus possibles efectes sobre el metabolisme de la glucosa, diversos treballs també apuntaven sobre la hipotètica participació d'aquesta citocina sobre el metabolisme lipídic. Així doncs, alguns autors atribuïen a la IL-6 un paper clau com a responsable de les anormalitats lipídiques que presenten els individus amb la síndrome de resistència a la insulina (*Pickup JC, 1997*). Tal com hem descrit extensament a la introducció aquesta hipòtesi es basava en el fet que certs marcadors de resposta de fase aguda, la síntesi dels quals és regulada principalment per la IL-6, augmenten en la circulació paral·lelament a la dislipèmia típica que presenten els pacients amb aquesta síndrome. A més a més, la IL-6 s'havia vist implicada de forma directa sobre el metabolisme dels lípids en la modulació de l'activitat de l'enzim lipoproteïna lipasa (*Greenberg AS, 1992*) i de forma indirecta per l'augment de la secreció hepàtica de triglicèrids (*Nonogaki K, 1995*) i l'augment en circulació dels àcids grassos.

Tenint en compte aquest possible paper fisiopatològic de la IL-6 en el metabolisme lipídic, en el nostre grup d'investigació va decidir continuar analitzant el polimorfisme – 174G>C. Com ja hem comentat en la introducció, aquest polimorfisme estava associat a diferents taxes de transcripció del gen de la citocina. La finalitat de les nostres investigacions era analitzar, en una població sana d'origen mediterrani, si aquest polimorfisme contribuïa genèticament a alterar els nivells circulants dels lípids.

Els resultats d'aquest treball indiquen que els individus portadors de l'al·lel G s'associen a nivells circulants més elevats d'àcids grassos lliures, tant en dejú com en estat postprandrial. També aquests individus presenten nivells més elevats de triglicèrids totals i de fraccions de VLDL. Pel que fa a la resta de paràmetres lipídics, hi havia una tendència a presentar els nivells d'HDLc més baixos i cap diferència amb les determinacions de les LDLc i VLDLc (taula 1). Aquest polimorfisme havia estat descrit com la causa d'alteracions en la transcripció del gen com a resposta a estímuls com l'endotoxina i la IL-

1. Concretament, “in vitro” els vectors portadors de l'al·lel G mostraven elevades taxes de transcripció del gen en comparació amb els portadors de l'al·lel C, i “in vivo” s'havia observat que els nivells circulants d'IL-6 són més alts en els individus portadors de l'al·lel G (*Fishman D, 1998*). En aquest sentit, els resultats del nostre treball donen suport a aquestes observacions, ja que els individus portadors de l'al·lel G mostren una tendència cap als nivells circulants d'IL-6 més elevats (taula1). De fet, els sis individus amb els nivells d'IL-6 més alts són tots portadors de l'al·lel G. No obstant això, el fet que s'observi entre els portadors en aquest darrer resultat una tendència i no unes diferències clarament significatives ( $p=0.09$ ) ens fa pensar en una determinació d'aquesta citocina poc sensible. Igual que el  $TNF\alpha$ , la IL-6 és una molècula molt làbil, que circula unida a fraccions solubles de receptors o a diverses proteïnes transportadores, algunes de les quals no són determinades pels immunoassaigs més usuals.

Els resultats d'aquest treball entre els nivells de la IL-6 i les relacions amb els paràmetres lipídics donen suport a les troballes descrites per diversos autors. Així, en població sana, s'han descrit valors de nivells més alts d'IL-6 associats a nivells alts de triglicèrids juntament amb baixes concentracions de nivells d'HDL (*Baggio G, 1998*), i en estudis epidemiològics amb individus amb diferents factors de risc cardiovascular, també nivells més alts d'IL-6 s'associen a altes concentracions de triglicèrids (*Mendall MA, 1997*). Junt amb les nostres troballes, podríem donar suport a la hipòtesi que aquells individus amb predisposició genètica per una elevada secreció d'IL-6 (els portadors de l'al·lel G) també estan predisposats a presentar els nivells circulants més alts de triglicèrids totals, VLDL<sub>tg</sub> i àcids grassos lliures, així com els nivells més baixos d'HDL<sub>c</sub> en comparació amb els individus portadors de l'al·lel C.

D'altra banda, el perfil lipídic associat als nivells circulants més elevats de la IL-6 que es descriu en aquest treball (augment de triglicèrids i VLDL<sub>tg</sub>, i disminució d'HDL<sub>c</sub>) és extensament conegut com un fenotip associat a malaltia cardiovascular a causa de les propietats aterogèniques d'aquestes lipoproteïnes. A part de la contribució de la IL-6 en l'aterogènesi mitjançant la inducció de molècules d'adhesió i l'augment de la permeabilitat, els resultats descrits anteriorment fan pensar en la possible implicació d'aquesta citocina en el procés aterògenic també per mitjà de la seva contribució a aquest estat de dislipèmia esmentat.

Amb les dades d'aquest treball és difícil donar una explicació per mitjà de possibles mecanismes moleculars pels quals la IL-6 pot influir en les anormalitats lipídiques observades. Alguns dels efectes que podríem suposar sorgeixen de la seva acció sobre els nivells dels àcids grassos lliures derivats d'estudis en animals d'experimentació. Així, l'efecte d'aquesta citocina sobre aquest paràmetre podria ser causat per la seva acció sobre l'activitat de la lipoproteïna lipasa del teixit adipós (*Greenberg AS, 1992*) o sobre la secreció dels triglicèrids hepàtics (*Nonogaki K, 1995*), dos llocs clau en la regulació dels nivells d'àcids grassos lliures circulants. També hi ha la possibilitat que els increments en la secreció de la IL-6 observats siguin el reflex de les accions d'altres citocines que es trobin d'una forma més propera involucrades en el metabolisme lipídic, o que la típica acció de les citocines en cascada pugi afectar l'acció de la IL-6. Una citocina que presenta les dues propietats és el TNF $\alpha$ . Tot i que, a diferència de la IL-6, no s'han descrit polimorfismes en el gen del TNF $\alpha$  que contribueixin a crear diferències significatives en les concentracions de lípids en el plasma (*Fernandez-Real JM, 1997*), són àmpliament coneguts alguns efectes d'aquesta citocina sobre el metabolisme lipídic com ja s'ha comentat a la introducció d'aquesta tesi. També alguns autors, entre els quals hi ha el nostre grup, han descrit correlacions significatives entre les fraccions solubles dels receptors 1 i 2 del TNF $\alpha$  i els nivells de triglicèrids totals i HDLc (*Fernandez-Real JM, 1999*) i entre la citocina i els nivells de les VLDLtg (*Jovinge S, 1998*).

En resum, en aquest treball descrivim un polimorfisme del gen de la IL-6 en la posició -174 que podria determinar diferències en els nivells circulants de certs paràmetres lipídics, concretament en els triglicèrids, en les VLDLtg i en els nivells d'àcids grassos lliures tant en l'estat dejú com en estat postpandrial.

## **6. CONCLUSIONS**

Les conclusions derivades dels estudis que formen aquesta tesi són les següents:

**ESTUDI 1.**

**Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 47:1757-62, 1998.**

- 1- L'augment dels nivells circulants de les sTNFR2 està associat a una menor sensibilitat a la insulina i a marcadors independents de resistència a la insulina com el BMI, la WHR i la FFM.
- 2- La determinació dels nivells circulants de les sTNFR2 pot ser marcador de resistència a la insulina mediada per TNF $\alpha$  en l'obesitat.

**ESTUDI 2.**

**Polymorphism of the tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 23:831-37, 2000.**

- 1- La regió del gen que codifica per al TNFR2 podria ser un marcador genètic de susceptibilitat a presentar diverses característiques fenotípiques de la síndrome metabòlica.

**ESTUDI 3**

**Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes* 49:517-20, 2000**

- 1- El polimorfisme de restricció G>C en la posició – 174 del gen de la interleucina 6 podria participar en la predisposició genètica en la determinació del grau de resistència a la insulina

#### **ESTUDI 4**

**Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. J Clin Endocrinol Metab 85:1334-39, 2000**

- 1- Els nivells circulants dels lípids plasmàtics podrien estar parcialment determinats per l'acció de variacions genètiques localitzades en el gen que codifica per la IL-6



## **7. BIBLIOGRAFIA**

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober S: *Cytokines*. En Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editores. *Celular and molecular immunology*. Filadelfia: Caunders,267-92, 1995..... 29
- Aderka D, Engelmann H, Maor Y, et al.: Stabilitation of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 175:323-29, 1992 ..... 32, 83
- Aggarwal B, and Natarajan K: Tumor necrosis factor:development during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 7:93-124, 1996 ..... 28
- Albert KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA. International text book of Diabetes Mellitus. Vol.1:437-46, 2 Edit 1997 ..... 18
- Arita Y, Kihara S, Morange P, et al.: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem and Bioph Res Co* 257:79-83, 1999 ..... 26
- Baggio G, Donazzan S, Monti D, et al.: Lipoprotein(a) and lipoprotein profile in healthy cantenarians: a reappraisal of vascular risk factors. *FASEB J* 12:433-37, 1998 ..... 96
- Baker E, Chen L, Smith C, et al.: Chromosomal localitation of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogenet Cell Genet* 57:117-18, 1991 ..... 32
- Barnett A, Eff C, Leslie R, et al.: Diabetes in identical twins: A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20:87-93, 1981..... 13
- Baron AD, Zhu JS, Zhu JH, et al.: Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity *J Clin Invest* 96(6):2792-01, 1995 ..... 22
- Barroso I, Gurnell M, Crowley VEF, et al.: Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880-83, 1999..... 23
- Bergman RN, Prager R, Volund A, et al.: Equivalence of the insulin sensitivity index in man derived by the minimal model method and euglycaemic glucose clamp. *J Clin Invest* 79:700-800, 1987..... 66
- Beutler B and Cerami A: Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflamatory resposte. *Endocr Rev* 9(1):57-66, 1988).. 34
- Beutler B and Cerami A: Cachectin: a monokine implicated as a mediator of cachexia and shock. *Lynfokines* 14:203-22, 1987 ..... 28
- Boden G and Chen X: Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 96:1261-68, 1995..... 23, 24

Boden G, Jadali F, White J, et al.: Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. <i>J Clin Invest</i> 88(3):960-66, 1991 .....	23
Boden G, Lebed B, Schatz M, et al.: Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. <i>Diabetes</i> 50:1612-17, 2001 .....	24
Boden G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. <i>Diabetes</i> 46:3-10, 1997 .....	15
Borkan GA, Hulth DE, Gerzof SG, et al.: Age changes in body composition revealed by computed tomography. <i>J Gerontol</i> 38:673-77, 1983 .....	14
Brakebusch C, Varfolomeev E, Batkin M, et al.: Structural requirements for inducible shedding of the p55 tumor necrosis factor receptor. <i>J Biol Chem</i> 269:32488-96, 1994 .....	32
Brinkman BM, Zuijdest D, Kaijzel EL, et al.: Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. <i>J Inflamm</i> 46(1):32-41, 1995-96.....	43
Burant CF, Sreenan S, Hirano K, et al.: Troglitazone action is independent of adipose tissue. <i>J Clin Invest</i> 100:2900-08, 1997 .....	23
Caput D, Beutler B, Hartog K, et al.: Identification of a common nucleotide sequence in the 3'untranslated region of messenger-RNA molecules specifying inflammatory mediators. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 83:1670-74, 1986.....	30
Caro J.F: Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without non-insulin-dependent diabetes. <i>J Clin Invest</i> 79:1330-37, 1987 .....	20
Carswell E, Old L, Kassell R, et al.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 72:3666-70, 1975 .....	28
Coleman DL: Obesity genes: beneficial effects in heterozygous mice. <i>Science</i> 203:663-65, 1979 .....	16
Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al.: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. <i>N Engl J Med</i> 334(5):292-95, 1996. 25	
Chagnon YC, Perusse L and Bouchard C: The human obesity gene map: the 1997 update. <i>Obes Res</i> 6:76-92, 1998.....	89
Chagnon YC, Perusse L, Lamothe M, et al.: Suggestive linkages between markers on human 1p32-p22 and body fat and insulin levels in the Quebec family Study. <i>Obes Res</i> 5:115-21, 1997.....	89
Charlotte H and Yuti Ch: Mutation of proline 211 reduces shedding of the human p75 TNF receptor. <i>J Immunol</i> 160:2478-87, 1998.....	33

- Charron MJ and Khan BB: Divergent molecular mechanisms for insulin-resistant glucose transport in muscle and adipose cells in vivo. *J Biol Chem* 265:7994-00, 1990..... 35
- Christian P, Peter S, John M, et al.: Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene. *Genomics* 35, 94-100, 1996 ..... 32
- D'Alfonso S and Richiardi PM: A polymorphic variation in putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 39(2):150-54, 1994..... 43
- De Vos P, Lefebvre A, Miller S, et al. > Thiazolidinediones repress ob gene expression via activation of PPAR $\gamma$ . *J Clin Invest* 98:1004-09, 1996..... 25
- Declercq W, Denecker G, Fiers W, et al.: Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: Involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol* 161:309-99, 1998..... 32
- DeFronzo RA: Glucose tolerance and aging. *Diabetes* 28:1099-01, 1979 ..... 14
- Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, et al.: Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular domain sequences. *Cytokine* 2:231-37, 1990..... 31
- Doerrler W, Feingold KR and Grunfeld C: Cytokines induce catabolic effects in cultured adipocytes by multiple mechanisms. *Cytokine* 6:478-84, 1994 ..... 34
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, et al.: The human IR cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signaling. *Cell* 40:747-58, 1985 ..... 17
- Evans DA, Jacobs DO and Wilmore DW: Tumor necrosis factor enhances glucose uptake by peripheral tissues. *Am J Physiol* 257 (5 Pt 2):R1182-89, 1989 ..... 35
- Facchini F, Hollenbeck CB, Chen YN, et al.: Demonstration of a relationship between white blood cell count, insulin resistance, and several risk factors for coronary heart disease in women. *J Intern Med* 232:267-72, 1992 ..... 92
- Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, et al.: Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 265(35):26055-58, 1993 ..... 35
- Ferguson-Smith AC, Chen YF, Newman MS, et al.: Regional localization of the interferon beta-2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. *Genomics* 2:203-08, 1988..... 45
- Fernandez-Real JM and Ricart W: Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia* 42:1367-74, 1999..... 16

- Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, et al.: Plasma levels of the tumor necrosis factor receptors 1 and 2 are independent determinants of plasma cholesterol and LDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Atherosclerosis* 146:321-27, 1999 ..... 97
- Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, et al.: The TNF-alpha gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 46(9):1468-72, 1997..... 43, 97
- Ferrannini E: Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19:477-90, 1998 ..... 12
- Fiengold KR, Adi S, Staprans I, et al.: Diet affects the mechanisms by which TNF stimulates hepatic triglyceride production. *Am J Physiol* 259:E177-87, 1990..... 34
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al.: The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369-76, 1998 ... 49, 91, 96
- Freidenberg G.R, Reichart D.R, Olefsky J.M, et al.: Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *J Clin Invest* 82:1398-06, 1988 ..... 19, 20
- Garrow GS, and Webster JD: Quetet's index as a measure of fatness. *Int J Obesity* 9:147-53, 1985 ..... 55, 60
- Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, et al.: 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(15):4113-116, 1992..... 48, 95, 97
- Grell M, Duoni E, Wajant H, et al.: The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-02, 1996 ..... 29
- Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, et al.: Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the *ob* product, in hamsters: a role for leptin in the anorexia of infection. *J Clin Invest* 97:2152-157, 1996..... 86
- Guo D and Donner DB: Tumor necrosis factor promotes phosphorylation and binding of insulin receptor substrate 1 to phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1. *J Biol Chem* 271(2):615-18, 1996 ..... 35
- Hallahan D, Spriggs D, Beckett M, et al.: Increased tumor necrosis factor mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10104-07, 1989..... 28
- Hansen T: Identification of a common amino acid polymorphism in the 85 $\alpha$  regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase: effects on glucose disappearance constant, glucose effectiveness and the insulin sensitivity index. *Diabetes* 46:494-01, 1997..... 21

- Hardy GH: Mendelian proportions in a mixed populations. *Science* 28:49-50, 1908..... 79
- Haruhiko O, Hioshi O, Akiko M, et al.: Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the resistin gene. The absence of evidence for the association of the three identified single nucleotide polymorphisms with japanese type 2 diabetes. *Diabetes* 51:863-66, 2002..... 27
- Hauer H, Petruschke T, Russ M, et al.: Effects of tumour necrosis factor alpha on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 38:764-71, 1995..... 34
- Heinrich PC, Castell JV and Andus T: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265:621-36, 1990..... 45
- Hidehiko K, Iichiro S, Yuko M, et al.: Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes. A candidate gene for insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51:2325-328, 2002 26
- Hirano T, Taga T, Nakano N, et al.: Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSPp-2). *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5490, 1985 ..... 45
- Hotamisligil GS and Spiegelman BM: Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271-78, 1994 ..... 15, 38
- Hotamisligil GS, Arner P, Atkinson R, et al.: Differential regulation of the p80 tumor necrosis receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes* 46:451-55, 1997 32, 43, 82, 83
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, et al.: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-15, 1995 ..... 83
- Hotamisligil GS, Bubavari A, Murray D, et al.: Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes:central role of tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 94: 1543-49, 1994..... 35
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, et al.: IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$  and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665-68, 1996..... 35, 36
- Hotta K, Funahaski T, Arita Y, et al.: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6):1595-99, 2000 ..... 26
- Houmard JA, Egan PC, Neuffer PD, et al.: Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle-aged men. *Am J Physiol* 261:E437, 1991..... 14

- Hu E, Liang P and Spiegelman B.M: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-703, 1996 ..... 26
- Hubbard SR, Wei L, Ellis L, et al.: Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human IR. *Nature* 372:746-54, 1994..... 17
- Hubbard SR: Crystal structure of the activated IR tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J* 16:5572-81, 1997..... 17
- Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, et al.: Resistin gene expression in humans adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 10(1):1-5, 2002 ..... 27
- Jones E, Stuart D and Walter N: Structure of tumor necrosis factor. *Nature* 338:225-28, 1989 ..... 29
- Jonsson A, and Wales JK: Blood glycoprotein levels in diabetes mellitus. *Diabetologia* 12:245-50, 1976..... 93
- Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, et al.: Evidence for a role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metabolism* 47:113-18, 1998 ..... 97
- Kadowaki T Bevins CL, Cama, A et at.: Two mutant alleles of the insulin receptor gene in a patient with extreme insulin resistance. *Science* 240:787-90, 1988 ..... 20
- Kadowaki T, Kadowaki H, Yazaki Y: Polimorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 328:1568-69, 1993 ..... 21
- Kahn BB: Facilitative glucosa transporters:regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest* 89:1367-74, 1992 ..... 21
- Kahn CR: Insulin action, diabetogenes and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43:1066-84, 1994 ..... 21
- Kahn SE, Leonetti DL, Prigeon RL, et al.: Proinsulin as a marker for the development of NIDDM in japanese-American men. *Diabetes* 44(2):173-9, 1995 ..... 12
- Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, et al.: Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389:374-77, 1997..... 25
- Kaufman BA, White PS and Brodeur G: A complex single strand conformational polymorphism (SSCP) in the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) gene chromosome 1p36.2. *Hum Mol Genet* 2(6):824, 1993..... 87
- Kawakami M, Murase T, Ogawa H, et al.: Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *J Biochem* 101:331-38, 1987 ..... 34

- Kellerer M and Haring H: Pathogenesis of human resistance: modulation of the insulin signal at receptor level. *Diabetes Res Clin Pract* 28 (Suppl.):S173-S177, 1995 ..... 22
- Kellerer M, Mushanck J, Seller E, et al.: Protein Kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity receptor in human kidney embryonic cells (Hek 293 Cells). *Diabetologia* 41:833-38, 1998..... 36
- Kemper O, Derre J, Cherif D, et al.: The gene for the type II (p75) tumor necrosis factor receptor (TNF-RII) is localized on band 1p36.2-p36.3. *Hum Genet* 87:623-24, 1994 ..... 32
- Kern PA, Sahizadeh M, Ong JM, et al.: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. *J Clin Invest* 95:2111-119, 1995 ..... 42
- Kirchgessner TG, Uysal KT, Wiesbrock SM, et al.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J Clin Invest* 100:2777-782, 1997..... 86
- Kissebah AH and Krakower GR: Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* 74:761-11, 1994 ..... 15, 83
- Kjos SL, Peters RK, Xiang C, et al.: Predicting future diabetes in Latino women with gestational diabetes\ Utility of early postpartum glucose tolerance testing. *Diabetes* 44:586-91, 1995..... 14
- Klieger M, Perez C, DeFay K, et al.: A novel form of TNF/cachectin is a surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53:45-53, 1988 ..... 29
- Kohrt WM, Kirwan JP, Staten MA, et al.: Insulin resistance in aging is related to abdominal obesity. *Diabetes* 42:273-71, 1993 ..... 61
- Kontoyiannis D, Pasparakis M, Piarro T, et al.: Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU -rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1:387-98, 1999 ..... 30
- Kostner GM, Molinari E, and Pichler P: Evaluation of a new HDL2/HDL3 quantitation method based on precipitation with polyethylene glycol. *Clin Chim Acta* 148: 139-47, 1985 ..... 67
- Krauss RM, Grunfeld C, Doerrler WT, et al.: Tumor necrosis factor acutely increases plasma levels of very low density lipoproteins of normal size and composition. *Endocrinology* 127:1016-21, 1990 ..... 34
- Kroeger KM, Carville KS and Abraham LJ: The -308 tumor necrosis factor - $\alpha$  promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 34:391-99, 1997..... 43
- Krook A and O'Rahilly S: Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Bailliere Clin Endocrinol Metab* 10:97-122, 1996 ..... 19



LaCava EC, Halter JB and Porte D: Failure of islet  $\beta$ -cell adaptation to insulin resistance in NIDDM. *Diabetes* 34(Supl. 1):297, 1985 ..... 12

Lang CH, Dobrescu C and Bagby GJ: Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 130:43-52, 1992. 35

Lemieux S, Prud'homme D, Nadeau A, et al.: Seven years changes in body fat and visceral adipose tissue in women, association with indices of plasma glucose-insulin homeostasis. *Diabetes Care* 19:983-91, 1996 ..... 14, 83

Liu L, Karkanas GB, Morales JC, et al.: Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J Bio Chem* 273:3110-67, 1998..... 25

Lyson K and McCann SM: The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro. *Neuroendocrinology* 54:262-66, 1991 ..... 45

Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I, et al.: leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor- $\alpha$  system in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3408-413,1997 ..... 86

Matsusaka T, Fujikawa K, Nishido Y, et al.: Transcription factors NF-IL6 and NF-Kappa B synergistically active transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10193-97, 1993 ..... 46

McClain DA and Crook ED: Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 45:1003-09, 1996 ..... 22

McGarry JD: What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on Diabetes. *Science* 258:766-70, 1992 ..... 24

McMillan DE: Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes. *Metabolism* 38:1042-46, 1989..... 93

Memon RA, Feingold KR, Moser AH, et al.: Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines. *Am J Physiol* 37:E210-17, 1998 ..... 34

Mendall MA, Patel P, Asante M, et al.: Relation of serum cytokine concentration to cardiovascular risk factors and coronary artery disease. *Heart* 78:273-77, 1997 ..... 96

Miles PD, Romero OM, Higo K, et al.: TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 46: 1678-83, 1997 ..... 34

Miyajima A, Kitamura T, Harada N, et al.: Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 10:295, 1992 ..... 46

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh a, et al.: Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196-200, 1997 ..... 49

Moller DE: Potencial role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrin Met* 11:212-17, 2000 ..... 39

Moller N, O'Brien P and Nair KS: Disruption of the relationship between fat content and leptin levels with aging in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 83:931-34, 1998..... 88, 89

Mullis K. And Faloona F: In *Methods in enzymology*. Vol.155, ed. R. Wu, Academic Press, New York and London, 1987, p.335. .... 72

Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, et al.: Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46:1360-63, 1997 ..... 25

Mynarcik DC, McNurlan MA, Steigbigel RT, et al.: Association of severe insulin resistance with both loss of limb fat and elevated serum tumor necrosis factor receptor levels in HIV lipodystrophy. *JAIDS* 25:312-21, 2000 ..... 84

Nagaev I and Smith U: Insulin resistance and Type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Bioph Res Co* 285:561-64, 2001 ..... 27

Nedwin G, Naylor S, Sakaguchi A, et al.: Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes:structure, homology and chromosomal localitation. *Nucleic Acids Res* 13:6361-73, 1985 ..... 30

Neel JV: Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progres?" *Am J Hum Genet* 14:353-62, 1962 ..... 15

Nguyen D, Eskandari M, DeForge L, et al.: Cyclosporin A modulation of tumor necrosis factor gene expression and effects in vivo and in vitro. *J Immunol* 144:3822-28, 1990..... 29

Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, et al.: Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 136:2143-49, 1995..... 48, 95, 97

Noriyuki O, Shinji K, Yukio A, et al.: Novel Modulator for endothelial adhesion molecules. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-476, 1999 ..... 26

O'Rahilly S, Turner RC and Matthews DR: Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *New Engl J Med* 318(19):1225-30, 1988 ..... 12

Oral EA, Simha V, Ruiz E, et al: Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 21:346(8):570-78, 2002..... 90

- Orban Z, Remaley AT, Sampson M, et al.: The differential effect of food intake and  $\beta$ -Adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2126-33, 1999 ..... 49, 91
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:2766, 1989 ..... 71
- Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, et al.: Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 46:983-88, 1997 ..... 24
- Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, et al.: Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol* 275:E294-E299, 1998 ..... 88
- Pape ME and Kim KH: Effect of tumor necrosis factor on acetyl-coenzyme A carboxylase gene expression and preadipocyte differentiation. *Mol Endocrinol* 2:395-03, 1988 ..... 34
- Paz K, Hemi R, LeRoith D, et al.: A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272(47):29911-18, 1997 ..... 36
- Pickup JC and Crook MA: Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41:1241-48, 1998 ..... 91, 93
- Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, et al.: NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40:1286-92, 1997 ..... 16, 49, 91, 93, 95
- Pugeat M, Bonneton A, Perrot D, et al.: Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. *Clin Chem* 35:1675-79, 1989 ..... 70
- Qian H, Hausman GJ, Compton MM, et al.: Leptin regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, tumor necrosis factor, and uncoupling protein-2 expression in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 246:660-67, 1998 ..... 89
- Quetelet LAS: Physique social. Vol.2 Brussels C. Muquardt, 92, 1869 ..... 60
- Reaven G, Hollenbeck C, Jeng C-Y, et al.: Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate and insulin for 24 h. In patients with NIDDM. *Diabetes* 37:1020-24, 1988 ..... 23
- Report of The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-97, 1997 ..... 56, 65
- Ricart W, Gonzalez-Huix F and Conde V: Evaluation of the nutritional status through determination of anthropometric parameters: new charts for the working population of

- Catalonia. Group for the evaluation of body composition in the population of catalonia.  
*Med Clin (Barc)* 100(18):681-91, 1993..... 63
- Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, et al.: Obesity associated with a mutations in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 339:953-59, 1998..... 23
- Rondinone C M: Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4171-75, 1997 ..... 20
- Rossetti L: Glucose toxicity: the implications of hyperglycemia in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 18:255-60, 1995 ..... 22
- Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, et al.: The expression of TNF $\alpha$  by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97:1111-16, 1996..... 28, 42, 83, 84
- Santomauro A, Boden G, Silva M, et al.: Overnight lowering of free fatty acids with acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes* 48:1836-41, 1999 ..... 24
- Schindler R, Mancilla J, Endres S, et al.: Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TMF) in human blood mononuclear cells: IL-6 supresses IL-1 and TNF. *Blood* 75:40-7, 1990 ..... 45
- Semb H, Peterson J, Tavernier J, et al.: Multiple effects of tumor necrosis factor on lipoprotein lipase in vivo. *J Biol Chem* 262:8390-94, 1987 ..... 34
- Sentinelli F, Romero S, Arca M, et al.: Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes. Mutation analysis and population study. *Diabetes* 51:860-62, 2002 ..... 27
- Shepherd PR, and Kahn BB: Glucosa transporters and insulin action. Implications for insulin resistance and diadetes mellitus. *N Engl J Med* 341:248-57, 1999 ..... 19
- Shereyer S, Chua S and LeBoeuf R: Obesity and diabetes in TNF- $\alpha$  receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 102(2):402-11, 1998 ..... 38
- Shimomura I, Tokunaga K, Katani K, et al.: Marked enhancement of acetyl-Co synthetase activity and mRNA in intra-abdominal visceral fat by physical exercise. *Am J Physiol* 265:44-50, 1993..... 24
- Sims EAH, Danforrth E Jr, Horton ES, et al.: Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Prog Horm Res* 29:457-96, 1973 ..... 14
- Smith C, Davis T, Anderson D, et al.: A receptor for the tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248:1019-23, 1990 ..... 31
- Smith C, Farrah T and Goodwind, R: The TNF receptor superfamily of celular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959-62, 1994 ..... 32

Spiegelman BM: PPAR $\gamma$ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47:507-14, 1998..... 22, 23

Stephens JM and Pekkala PH: Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ : regulation is coordinate and independent of protein synthesis. *J Biol Chem* 267:13580-84, 1992 ..... 35

Stephens JM and Pekkala PH: Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 266:21839-45, 1991..... 35

Stephens JM, Lee J and Pilch PF: Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 272(2):971-76, 1997 ..... 36

Steppan C, Bailey S, Bhat S, et al.: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-12, 2001..... 26

Stouthard JM, Romijn JA, Van Der Poll T, et al.: Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 humans. *Am J Physiol* 268:E813-E819, 1995..... 49

Stuber F, Udalova IA, Book M, et al.: -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm* 46(1):42-50, 1995-96..... 43

Targher G, Seidell JC, Tonoli M, et al.: The white blood cell count: its relationship to plasma insulin and other cardiovascular risk factors in healthy male individuals. *J Intern Med* 239:435-41, 1996..... 92

Tartaglia L, Pennica D, Goeddel D: Ligand passing: The 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 268:18.542-48, 1993..... 32

Tsai EY, Yie J, Thanos D, et al.: Cell-type-specific regulation of the tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol Cell Biol* 16:5232-44, 1996 ..... 30

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, et al.: Human IR and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313:756-61, 1985..... 17

Uysal K, Wiesbrock S and Hotamisligil G: Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF- $\alpha$ -mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 139:4832-38, 1998..... 39

Uysal K, Wiesbrock S, Marino M, et al.: Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* 389(9):610-14, 1997..... 38, 39

- Vague J: La differentiation sexuelle, facteur determinant des formes d'obesité. *La Presse Medicale* 53:339, 1947 ..... 61
- Van Dijk W and Mackiewicz A: Interleukin-6-type cytokine-induced changes in acute phase protein glycosylation. *Ann N Y Acad Sci* 762:319-30, 1995 ..... 92
- Ventre J, Doebber T, Wu M, et al.: Targeted disruption of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene. *Diabetes*, 46:1526-31, 1997 ..... 38
- Vgontzas AN, Papnicolaou DA, Bixler EO, et al.: Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1313-16, 1997 ..... 49
- Vionnet N, Hani EI-H, Dupont S, et al.: Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet* 67:1470-80, 2000..... 26
- Wahlefeld AW: Lipoproteins. In *Methoden der Enzymatischen Analyse*. Vol. 2, 3rd ed. Bergmeyer HU, Ed. Weinheim, Germany, Verlag Chemie, 1974, p. 187-88 ..... 68
- Weidner MD, Gavigen KE, Tyndall GL, et al.: Which anthropometric indices of regional adiposity are related to the insulin resistance of aging?. *Int J Obesity* 19:325-30, 1995 .... 61
- Weiss T, Grell B, Hessabi S, et al.: Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor 2 binding site. *J Immunol* 158:2398, 1997 ..... 32
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al.: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol. Metab* 86:1930-35, 2001 ..... 26
- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore et al.: Single base polymorphism in the human necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1(5):353, 1992 ..... 43
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al.: Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 94:3195-199, 1997..... 43
- Wu WS and McClain KL: DNA polymorphisms and mutations of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH). *J Interferon Cytokine Res* 17(10):631-35, 1997 ..... 43
- Wurtman RJ: What is leptin for and does it act on the brain? *Nat Med* 2:294-93, 1996 .... 26

- Yoshimura R: Impact of natural IRS-1 mutations of insulin signals: mutations of IRS-1 in the PTB domain and near SH2 protein binding sites result in impaired function at different steps of IRS-1 signaling. *Diabetes* 46:929-36, 1997 ..... 20
- Zawalich WS and Kelley GG: The pathogenesis of NIDDM: the role of the pancreatic beta cell. *Diabetologia* 38:986-91, 1995 ..... 12
- Zhang X, Webwer M and Chen M: Site directed mutational analysis of human tumor necrosis factor-alpha receptor binding site and structure-functional relationship. *J Biol Chem* 267: 24069-75, 1992 ..... 29
- Zumbach MS, Boehme MW, Wahl P, et al.: Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4080-82, 1997 ..... 86