



Universitat de Girona

# IMPLICACIONES DE LA ADIPONECTINA DE ALTO PESO MOLECULAR EN EL EJE TIROIDEO Y EL METABOLISMO ÓSEO

**Anna PRATS PUIG**

**Dipòsit legal: GI. 1190-2012**

<http://hdl.handle.net/10803/83572>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESIS DOCTORAL

IMPLICACIONES DE LA ADIPONECTINA  
DE ALTO PESO MOLECULAR  
EN EL EJE TIROIDEO Y  
EL METABOLISMO ÓSEO.

**Anna Prats Puig**

**2012**





**Universitat de Girona**

**TESIS DOCTORAL**

**IMPLICACIONES DE LA ADIPONECTINA  
DE ALTO PESO MOLECULAR  
EN EL EJE TIROIDEO Y  
EL METABOLISMO ÓSEO.**

**Anna Prats Puig**

**2012**

**Ciències experimentals i sostenibilitat**

**Dirigida por:**

**Dr. Abel López Bermejo**

Investigador I3

Institut d'Investigació Biomèdica de Girona

Médico adjunto de Pediatría

Servicio de Pediatría, Hospital de Girona

**Dra. Judit Bassols Casadevall**

Investigadora postdoctoral Sara Borrell

Institut d'Investigació Biomèdica de Girona



## Agraïments

Vaig començar la tesina de la mateixa manera però no se me n'acut cap de millor per començar la tesi i és que és ben veritat, totes les pàgines del món no serien suficients per agrair, de la manera que s'ho mereixen, a totes les persones que m'han ajudat a realitzar aquesta tesi doctoral.

Primer de tot, m'agradaria agrair molt especialment al Dr. Abel López-Bermejo l'oportunitat de treballar al seu costat i la gran quantitat de coses que m'ha arribat a ensenyar durant tot aquest temps. Bé, no només de la quantitat de coses, sinó també agrair la seva insistència i paciència per ensenyar-me a fer les coses ben fetes! Espero haver-ho aconseguit alguna vegada! També agrair molt especialment a la Dra. Judit Bassols tota l'ajuda incondicional, no només en la redacció i direcció d'aquesta tesi, sinó per ensenyar-me de TOT, escoltar-me i haver confiat sempre en mi! Moltes gràcies a tots dos! I també a la nostra inestimable recent incorporació, a la Gemma! En aquest apartat, no puc oblidar la Dra. Pilar Soriano, que de ben segur que sense les seves xerrades, consells i experiència en el laboratori tot hagués estat molt més difícil!

També m'agradaria agrair molt especialment a tots els companys i companyes del laboratori (per motius d'espai no els anomenaré un per un, però això no els resta importància), la seva inestimable ajuda tant en el camp professional com personal. De la mateixa manera no em puc oblidar de la gent del Trueta, que cadascú, en el seu àmbit, sempre m'han ajudat amb tot el que he necessitat.

Finalment m'agradaria agrair molt especialment a l'Albert, que espero que sàpiga que sense ell tot hagués estat molt més difícil, als meus pares, a les meves germanes i al meu cunyat, pel suport que m'han donat, i per l'estrès i els nervis que han hagut d'aguantar! En aquest apartat tampoc puc oblidar la família de l'Albert i tots els meus amics, que, en tot el que han pogut, sempre m'han ajudat.

Moltes gràcies a tots de nou perquè sense vosaltres, aquesta tesi no hagués estat possible.



## **Publicaciones derivadas de esta tesis**

El contenido fundamental de la tesis está basado en los siguientes tres artículos:

### ARTICULO I:

Prats-Puig A, Sitjar C, Ribot R, Calvo M, Clausell-Pomés N, Soler-Roca M, Soriano-Rodriguez P, Osiniri I, Ros-Miquel M, Bassols J, de Zegher F, Ibanez L, Lopez-Bermejo A. Relative hypoadiponectinemia, insulin resistance, and increased visceral fat in euthyroid prepubertal girls with low-normal serum free thyroxine. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jul 7. doi: 10.1038/oby.2011.206. [Epub ahead of print] FI: 3.531

### ARTICULO II:

Prats-Puig A, Mas-Parareda M, Riera-Pérez E, González-Forcadell D, Mier C, Mallol-Guisset M, Diaz M, Bassols J, de Zegher F, Ibanez L, Lopez-Bermejo A. Carboxylation of osteocalcin affects its association with metabolic parameters in healthy children. *Diabetes Care*. 2010 Mar;33(3):661-3. Epub 2009 Dec 15. FI: 7.141

### ARTICULO III:

Prats-Puig A, Puig T, Sitjar C, Mas-Parareda M, Grau-Cabrera P, Soriano-Rodriguez P, Montesinos-Costa M, Diaz M, de Zegher F, Ibanez L, Bassols J, Lopez-Bermejo A. Soluble fatty acid synthase relates to bone biomarkers in prepubertal children. *Osteoporos Int*. 2011 Aug 30. [Epub ahead of print] FI: 4.859



## Tabla de abreviaciones

Adiponectina de APM	Adiponectina de alto peso molecular
AdipoR	Receptor de adiponectina
AGL	Ácidos grasos libres
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
ATP	Adenosina trifosfato
CTX	Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I
ELISA/EIA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
FASN	Sintasa de ácidos grasos
Gla-OC	Residuos carboxilados de la OC
Glu-OC	Residuos descarboxilados de la OC
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HOMA-IR	Estimación de la resistencia a la insulina
HOMA-Beta	Estimación de la secreción de insulina
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IMC	Índice de masa corporal
JNK-1	Jun N-terminal quinasa 1
LPL-1	Lipoprotein-lipasa 1
MMPs	Metaloproteínas de la matriz ósea
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
OC	Osteocalcina
OCc	Osteocalcina carboxilada

OCdc	Osteocalcina descarboxilada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPAR- $\alpha$	Receptor activado por proliferador de peroxisoma alfa
PRTG	Lipoproteínas ricas en triglicéridos
RANKL	Receptor activador del factor nuclear-kB
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina o tetrayodotironina
TRH	Hormona liberadora de tirotropina o tiroliberina
TSH	Tirotropina
Valor z del IMC	Índice de masa corporal estandarizado

# Índice

Agradecimientos .....	i
Publicaciones derivadas de esta tesis .....	ii
Tabla de abreviaciones.....	iii
Resum .....	1
Resumen .....	3
Summary.....	5
1 INTRODUCCIÓN .....	7
1.1 La adiponectina .....	9
1.1.1 Estructura.....	10
1.1.2 La adiponectina de alto peso molecular .....	10
1.1.3 Receptores y mecanismo de acción de la adiponectina .....	12
1.1.4 Enfermedades asociadas a alteraciones de la adiponectina.....	15
1.1.4.1 Obesidad.....	15
1.1.4.1.1 La obesidad infantil .....	15
1.1.4.1.2 Adiponectina y obesidad.....	17
1.1.4.1.3 Adiponectina y distribución de la grasa corporal.....	18
1.1.4.2 El síndrome de la resistencia a la insulina .....	19
1.1.4.2.1 La resistencia a la Insulina.....	19
1.1.4.2.2 Adiponectina y resistencia a la insulina .....	21
1.1.4.3 Riesgo Cardiovascular .....	22
1.1.4.3.1 Enfermedad coronaria .....	22
1.1.4.3.2 Adiponectina y enfermedad coronaria .....	22
1.2 El tejido adiposo .....	23

1.2.1 Características del tejido adiposo.....	23
1.2.2 Tejido adiposo como órgano endocrino.....	25
1.2.3 Sintasa de ácidos grasos y metabolismo energético.....	26
1.3 El eje tiroideo.....	27
1.3.1 Características principales.....	28
1.3.2 Hormonas tiroideas.....	29
1.3.3 Relación entre el eje tiroideo y parámetros endocrino-metabólicos.....	31
1.4 El tejido óseo.....	31
1.4.1 Características principales.....	32
1.4.2 Marcadores óseos.....	33
1.4.2.1 La osteocalcina.....	34
1.4.2.2 Fosfatasa alcalina ósea.....	36
1.4.2.3 Telopéptido caboxiterminal del colágeno tipo 1.....	36
1.4.3 Relación entre la adiponectina y el metabolismo óseo.....	37
2 HIPÓTESIS.....	41
3 OBJETIVOS.....	45
4 MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
4.1 Diseño.....	51
4.2 Consideraciones éticas.....	51
4.3 Sujetos de estudio.....	51
4.4 Criterios de inclusión y exclusión de los sujetos.....	52
4.5 Variables.....	52
4.5.1 Variables clínicas.....	52
4.5.2 Variables analíticas.....	54

4.6 Biopsias de tejido adiposo .....	56
4.7 Recogida y análisis de datos .....	57
5 RESULTADOS.....	59
5.1 Artículo I: .....	61
5.2 Artículo II: .....	71
5.3 Artículo III: .....	77
6 DISCUSIÓN .....	85
6.1 Feedback entre tejido adiposo y eje tiroideo.....	87
6.1.1 Adiponectina y hormonas tiroideas .....	87
6.2 Feedback entre el tejido adiposo y el hueso.....	91
6.2.1 Adiponectina y osteocalcina.....	91
6.2.2 Adiponectina, FASN y marcadores óseos .....	94
6.3 Discusión conjunta de los resultados.....	97
7 CONCLUSIONES.....	101
8 BIBLIOGRAFÍA .....	105



## Resum

L'adiponectina és una proteïna secretada pel teixit adipós que té propietats insulinosensibilitzants i anti-arterioscleròtiques. Diversos autors han descrit que pot ser considerada com a nexa d'unió entre el teixit adipós, la resistència a la insulina i la malaltia cardiovascular. A més a més, se sap que tant les hormones tiroïdals com l'osteocalcina (OC) de l'os i la sintasa soluble d'àcids grassos (FASN soluble), juguen un paper important en la regulació de l'homeòstasi energètica de l'organisme.

En aquest treball s'estudiarà l'adiponectina d'alt pes molecular (APM) com a molècula clau en la interacció entre el metabolisme energètic, l'eix tiroïdal i el metabolisme ossi en l'edat pediàtrica.

Amb aquesta finalitat, s'ha dissenyat un estudi clínic descriptiu transversal en una mostra de nens sans de 6 a 9 anys d'edat (n = 234; 113 nens i 121 nenes), provinents de la població general i reclutats en diversos centres d'atenció primària de la província de l'Alt Empordà. A tots ells se'ls va realitzar un examen clínic i antropomètric. També es va obtenir una mostra de sang en dejú que es va utilitzar per realitzar una analítica general i quantificar els marcadors de l'estudi, que inclouen: l'adiponectina d'APM, les hormones tiroïdals (TSH i T4), diversos marcadors ossis (entre altres, la OC total i descarboxilada), la vitamina D i la FASN soluble. Addicionalment, es van obtenir biòpsies de teixit adipós visceral de 6 nens sans (3 nens i 3 nenes) que es van sotmetre a una intervenció quirúrgica programada per causes externes a l'estudi. Aquest teixit adipós es va utilitzar en estudis *ex vivo* per analitzar la regulació de l'adiponectina per les hormones tiroïdals.

Els resultats derivats d'aquest estudi mostren una associació positiva de l'adiponectina d'alt pes molecular amb la T4 lliure i la FASN soluble i negativa amb la OC carboxilada (OCc).

Concentracions més baixes de T4, dins dels rangs fisiològics de normalitat, s'associen amb un perfil metabòlic més desfavorable, amb una disminució de l'adiponectina d'APM i un increment tant de resistència a la insulina (HOMA-IR) com de grassa visceral en nenes sanes. Els estudis *ex vivo* mostren la capacitat de les hormones tiroïdals per regular la secreció de l'adiponectina total i d'APM.

Per altra banda, les diferents formes de carboxilació de l'osteocalcina es relacionen, de manera dependent del pes corporal, amb marcadors del metabolisme energètic. Concretament, un augment del percentatge d'OC descarboxilada (OCdc), es relaciona amb una major secreció d'insulina (HOMA-Beta), mentre que l'augment de OCc es relaciona negativament amb l'adiponectina d'APM.

Així mateix, existeix una relació positiva entre la FASN soluble i l'adiponectina d'APM. Aquesta relació podria ser explicada per l'augment d'activitat AMPK que, en resposta a l'adiponectina d'APM, estimularia la secreció de FASN del citosol. Finalment, s'observa una relació negativa entre FASN soluble i la OC total i descarboxilada, i positiva amb marcadors de remodelació òssia (relació CTX-fosfatasa alcalina). Aquestes associacions són més importants en individus amb una concentració baixa de vitamina D, fet que suggereix que l'augment de FASN soluble i d'adiponectina d'APM es puguin relacionar amb un perfil metabòlic ossi més desfavorable.

Aquests resultats aporten noves evidències de l'important paper de l'adiponectina d'APM com a marcador biològic de la regulació comuna entre el teixit adipòs, l'eix tiroïdal i el metabolisme ossi en edat pediàtrica.

## Resumen

La adiponectina es una proteína secretada por el tejido adiposo que posee propiedades insulinosensibilizantes y anti-arterioscleróticas. Diversos autores han descrito que puede ser considerada como nexo de unión entre tejido adiposo, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. Además, es conocido que tanto las hormonas tiroideas como la osteocalcina (OC) del hueso y la sintasa soluble de ácidos grasos (FASN soluble) juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis energética del organismo.

En este trabajo se estudiará la adiponectina de alto peso molecular (APM) como molécula clave en la interacción entre el metabolismo energético, el eje tiroideo y el metabolismo óseo en la edad pediátrica.

Para tal fin, se ha diseñado un estudio clínico descriptivo transversal en una muestra de niños sanos de 6 a 9 años de edad (n=234; 113 niños y 121 niñas), provenientes de la población general y reclutados en diversos centros de atención primaria de la provincia de *l'Alt Empordà*. A todos ellos se les realizó un examen clínico y antropométrico. Se obtuvo, además, una muestra de sangre en ayunas que se utilizó para realizar una analítica general y cuantificar los marcadores de estudio, que incluyeron: la adiponectina de APM, las hormonas tiroideas (TSH y T4), diversos marcadores óseos (entre otros la OC total y descarboxilada), la vitamina D y la FASN soluble. Adicionalmente, se obtuvieron biopsias de tejido adiposo visceral de 6 niños sanos (3 niños y 3 niñas) que se sometieron a una intervención quirúrgica programada por causas externas al estudio. Este tejido adiposo se utilizó en estudios *ex vivo* para analizar la regulación de la adiponectina por las hormonas tiroideas.

Los resultados derivados de este estudio muestran una asociación positiva de la adiponectina de APM con la T4 libre y la FASN soluble y negativa con la OC carboxilada (OCc).

Concentraciones más bajas de T4, dentro del rango fisiológico de normalidad, se asocian a un perfil metabólico más desfavorable, con una disminución de la adiponectina de APM, y un incremento tanto de resistencia a la insulina (HOMA-IR) como de grasa visceral en niñas sanas. Los estudios *ex vivo* muestran la capacidad de las hormonas tiroideas para regular la secreción de la adiponectina total y de APM.

Por otra parte, las diferentes formas de carboxilación de la osteocalcina se relacionan, de manera dependiente del peso corporal, con marcadores del metabolismo energético. Concretamente, un aumento del porcentaje de OC descarboxilada (OCdc), se relaciona con una mayor secreción de insulina (HOMA-Beta), mientras que el aumento de la OCc se relaciona negativamente con la adiponectina de APM.

Asimismo, existe una relación positiva entre la FASN soluble y la adiponectina de APM. Esta relación podría ser explicada por el aumento de actividad AMPK que, en respuesta a la adiponectina de APM, estimularía la excreción de FASN del citosol. Finalmente, se observa una relación negativa entre FASN soluble y la OC total y descarboxilada, y positiva con marcadores de remodelación ósea (relación CTX-fosfatasa alcalina). Estas asociaciones son más importantes en individuos con concentraciones bajas de vitamina D, hecho que sugiere que el aumento de FASN soluble y de adiponectina de APM se pueda relacionar con un perfil metabólico óseo desfavorable.

Estos resultados aportan nuevas evidencias del importante papel de la adiponectina de APM como marcador biológico de la regulación común entre el tejido adiposo, el eje tiroideo y el metabolismo óseo en la edad pediátrica.

## Summary

Adiponectin is a protein secreted by adipose tissue which possesses insulin-sensitivity and anti-atherosclerotic properties. Several authors have described that adiponectin can be considered as a link between adipose tissue, insulin resistance and cardiovascular disease. Moreover, it is known that thyroid hormones, osteocalcin (OC) from the bone, and soluble fatty acid synthase (sFASN) play important roles in the regulation of energy homeostasis.

In this work, we will study if high molecular weight (HMW) adiponectin is a key molecule in the association between energy metabolism, thyroid axis and bone metabolism in children.

To this end, we studied a population consisting of 234 asymptomatic Caucasian children (113 boys and 121 girls, age  $6.8 \pm 0.1$  yr) enrolled in a clinical descriptive cross-sectional study of cardiovascular risk factors. These children were recruited among those seen within a setting of preventive medicine in *l'Alt Empordà*. All subjects underwent an anthropometric and clinical examination. A sample of blood was also collected in fasting state to perform biochemical analyses to quantify the markers for the study, including: HMW adiponectin, thyroid hormones (TSH and T4), several bone markers (including total and undercarboxylated OC), vitamin D and sFASN. We also obtained biopsies of visceral adipose tissue from 6 additionally healthy children (3 boys and 3 girls) for reasons unrelated to the study. These biopsies were used *ex vivo* to assess the regulation of adiponectin by thyroid hormones.

The results derived from this study show a positive association of high molecular weight adiponectin with free T4 and soluble FASN and a negative association with carboxylated OC (cOC).

Lower concentrations of T4, within the normal physiological range, are associated with an unfavorable metabolic profile, with a decrease in HMW adiponectin and an increase in both insulin resistance (HOMA-IR) and visceral fat in healthy girls. *Ex vivo* studies show the ability of thyroid hormones to regulate the secretion of total and HMW adiponectin.

Moreover, the different forms of carboxylation of osteocalcin are related with markers of energy metabolism, with associations that are dependant on body weight. Specifically, an increased percentage of undercarboxylated OC (ucOC) is associated with increased insulin secretion (HOMA-Beta), while an increase in cOC is negatively correlated with HMW adiponectin.

There is also a positive relationship between soluble FASN and HMW adiponectin. This relationship could be explained by increased AMPK activity that, in response to HMW adiponectin, stimulates the excretion of FASN from the cytosol. Finally, there is a negative relationship between soluble FASN and total and undercarboxylated OC, and a positive association with markers of bone turnover (CTX-BASP ratio). These associations are more important in those children with lower levels of vitamin D, suggesting that an increase in soluble FASN and HMW adiponectin may be related to an unfavorable bone metabolic profile.

These results provide further evidence of the important role of HMW adiponectin as a biomarker of the common regulation between adipose tissue, the thyroid axis and bone metabolism in healthy children.

# **1 INTRODUCCIÓN**



## 1.1 La adiponectina

La adiponectina es una proteína producida principalmente por el tejido adiposo y liberada al torrente circulatorio a elevadas concentraciones. Aproximadamente, la concentración de adiponectina (5-10 $\mu$ g/ml) representa un 0,01% del total de proteínas séricas(1).

Una de las características más importantes de la adiponectina es que disminuye en casos de obesidad y diabetes(2; 3). Además, las concentraciones circulantes de esta hormona están relacionadas negativamente con el tamaño de los adipocitos y con el porcentaje de masa grasa corporal(1; 3; 4). Existe también un dimorfismo sexual para su concentración sérica. Concretamente, las mujeres presentan unos valores más elevados que los hombres, debido a que el sexo femenino es más sensible a la insulina que el masculino(5). Actualmente, la adiponectina es una de la adipoquinas más estudiadas por su importante papel como nexo de unión entre la obesidad, la resistencia a la insulina y las enfermedades cardiovasculares (Figura 1).



Figura 1: Factores o estados patológicos que afectan a los niveles de adiponectina: resumen de las diferentes condiciones o enfermedades que están asociadas a niveles altos (flecha verde) o niveles bajos (flecha roja) de adiponectina. (Esquema adaptado de Trujillo y Scherer 2005).

### 1.1.1 Estructura

La adiponectina es una proteína de 30 kDa formada por 244 aminoácidos y codificada por tres exones del gen ADIPOQ, localizado en el cromosoma 3q27(1; 6; 7).

La molécula de adiponectina presenta 4 regiones diferentes: la primera consiste en un péptido señal

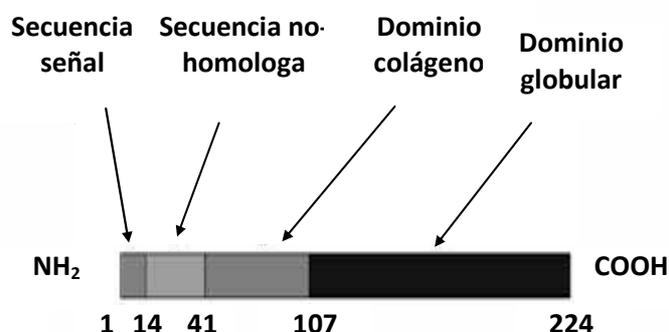


Figura 2: Estructura de la adiponectina donde se observan los cuatro dominios y el número de aminoácidos que componen cada dominio. (Adaptado de Kadowaki et al 2005)

corto en el extremo N-terminal que permite la secreción de la hormona al exterior de la célula. La siguiente región consiste en un fragmento pequeño que varía entre las especies; la tercera es un dominio colágeno de 65 aminoácidos. Y finalmente, la región C-terminal consiste en un dominio globular (Figura 2)(1; 2)

### 1.1.2 La adiponectina de alto peso molecular

La adiponectina no circula nunca en forma de monómeros, sino que a causa de interacciones en el dominio colágeno, la estructura monomérica se agrega formando diferentes formas multiméricas. Estas formas incluyen la adiponectina de bajo peso molecular (BPM) formada por la unión de tres monómeros. La forma hexamérica, de peso molecular mediano (PMM), formada por la unión de dos trímeros mediante puentes disulfuro, y la forma de alto peso molecular (APM), de aproximadamente 500 kDa construida por la unión no covalente de ocho o más hexámeros (Figura 3)(8).

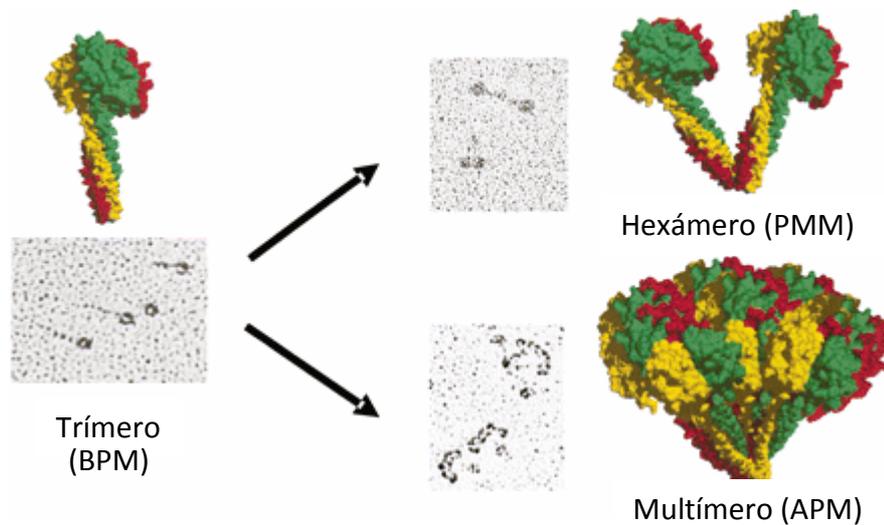


Figura 3: Esquema donde se representan las diferentes formas moleculares de la adiponectina. (Adaptado de American Diabetes Association, 2006)

Se cree que la función biológica y el mecanismo de secreción son diferentes para cada una de las formas de la adiponectina. Además, se ha sugerido que el porcentaje de cada forma en relación con la adiponectina total puede variar en función de las diferentes condiciones fisiológicas(8).

Estudios recientes demuestran que es la forma de APM la que está considerada como la forma biológicamente activa de la proteína y la que se ha relacionado con el desarrollo del síndrome metabólico(4). Concretamente, se ha demostrado que bajas concentraciones de adiponectina de APM se correlacionan con varios componentes del síndrome metabólico, tales como: una distribución de masa grasa en la mitad superior del cuerpo, resistencia a la insulina, disminución de la oxidación de lípidos, aumento del colesterol y disminución de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL)(2; 4). Estas observaciones indican la importancia, desde un punto de vista clínico, de medir las concentraciones de los multímetros(8).

### 1.1.3 Receptores y mecanismo de acción de la adiponectina

La adiponectina es una hormona que modula un gran número de procesos metabólicos(1; 3; 4). Concretamente, juega un papel muy importante en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. Diversos estudios han comprobado que la adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina en diversos tejidos como el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado. Sus concentraciones circulantes también se relacionan negativamente con las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina, triglicéridos y resistencia a la insulina. Además, se ha observado que la adiponectina reduce los niveles de glucosa en diferentes modelos animales de diabetes mellitus y obesidad, incrementa la oxidación de los ácidos grasos en músculo e hígado y disminuye la inflamación vascular (Figura 4).

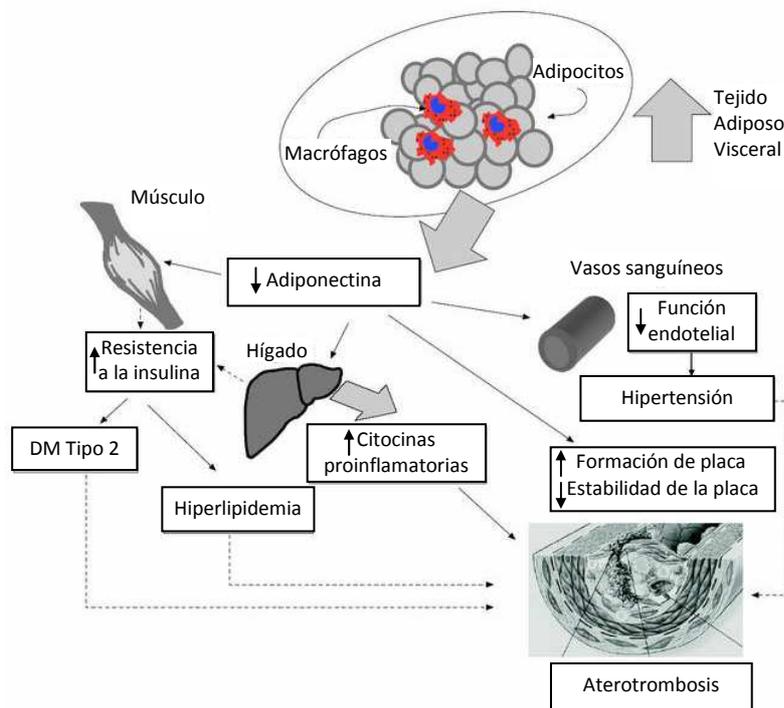


Figura 4: Esquema donde se representan algunos procesos metabólicos modulados por la adiponectina. (Adaptado de Josep Vidal y cols. 2008)

Estos efectos pueden ser explicados por la unión de la adiponectina a distintos receptores en la superficie celular (Figura 5). El receptor adipo R1 es muy abundante

en el músculo esquelético mientras que el adipo R2 se expresa mayormente en el hígado(9).

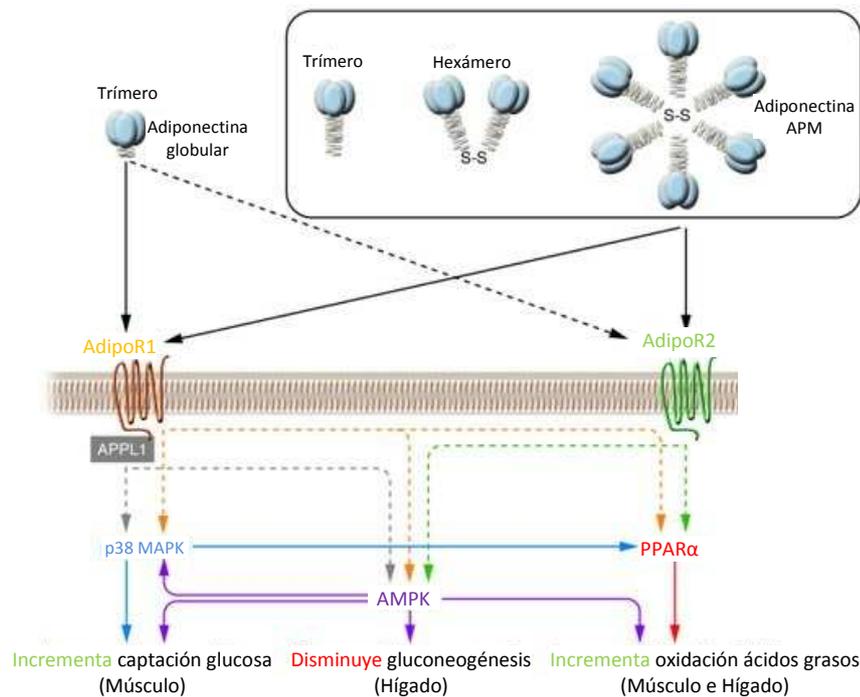


Figura 5: Esquema donde se representa el receptor de adiponectina y el efecto de la activación del receptor por la adiponectina. (Adaptado de Kadowaki, T. 2006).

La unión de la adiponectina a los receptores adipoR1 y adipoR2 activa la quinasa de AMP (AMPK) e induce la expresión del proliferador del peroxisoma alfa (PPAR- $\alpha$ ). Dicha unión, también aumenta la expresión génica de los enzimas implicados en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y en la captación de glucosa(10-13). La adiponectina, a través de la activación de AMPK, también disminuye la producción hepática de glucosa al inhibir los enzimas de la gluconeogénesis y contribuye así a la reducción de la glucemia en animales diabéticos y no diabéticos(8; 14; 15).

Concretamente, en el músculo esquelético, la adiponectina aumenta la fosforilación de la tirosina del receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) lo que favorece la insulinosensibilidad. Además, aumenta la captación de glucosa, por estímulo de GLUT-4, y aumenta la producción de lactato.

También induce la fosforilación de la enzima acetil-CoA carboxilasa y con ello su inhibición, hecho que favorece la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos libres (AGL) e incrementa la actividad del PPAR- $\alpha$  para amplificar la oxidación de los AGL (Figura 6)(16).

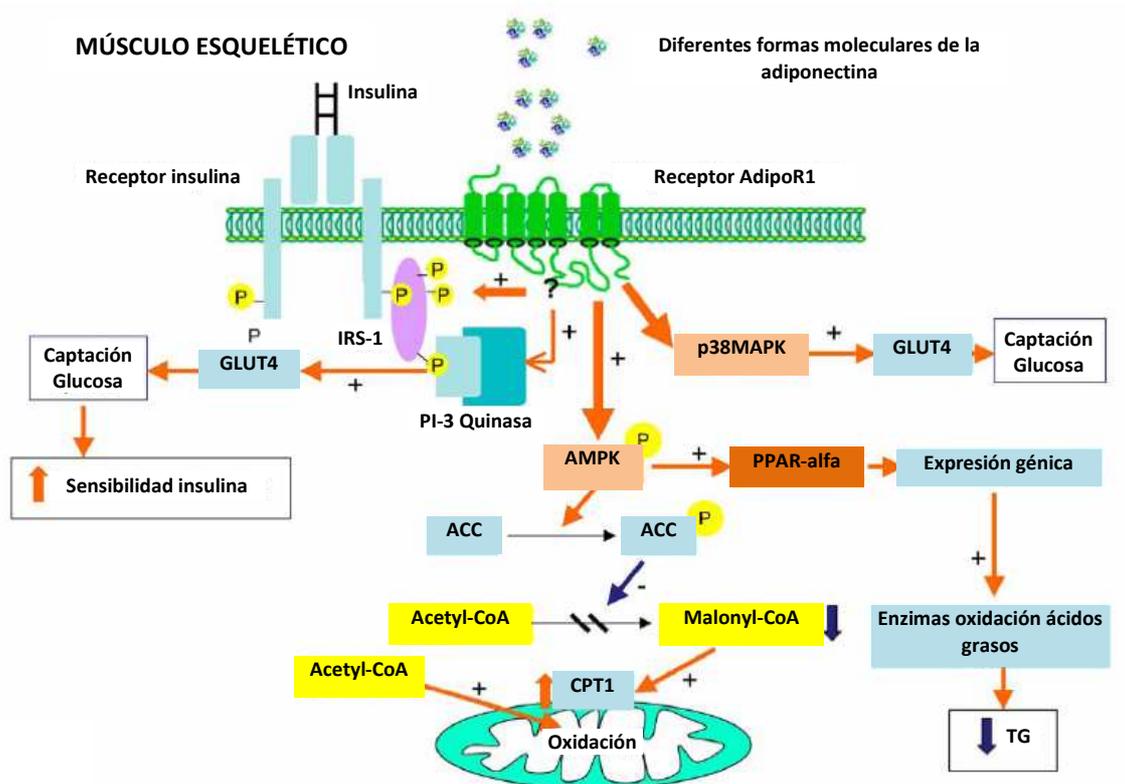


Figura 6: Modelo de acción de la adiponectina en el músculo esquelético. ACC: Acetil-CoA carboxilasa; AMPK: quinasa dependiente de AMP; CPT1: Carnitina palmitoil transferasa 1; Glucose-6-Pase: Glucosa-6- fosfatasa; GLUT4: Transportador de glucosa 4; IRS-1: sustrato del receptor de insulina-1; PI-3 kinase: fosfatidil inositol 3-quinasa; p38MAPK: quinasa p38 activada por mitógeno; PEPCK: fosfoenol piruvat carboxilasa; PPAR: receptor activador de la proliferación de los peroxisomas; TG: triglicéridos. (Esquema adaptado de Gil-Campos y cols 2004)

En el hígado, la adiponectina regula dos enzimas clave para la gluconeogénesis: la fosfoenol-piruvato-carboxiquinasa y la glucosa 6- fosfatasa, y, como consecuencia, produce descenso de los niveles glucémicos (Figura 7)(16, 17).

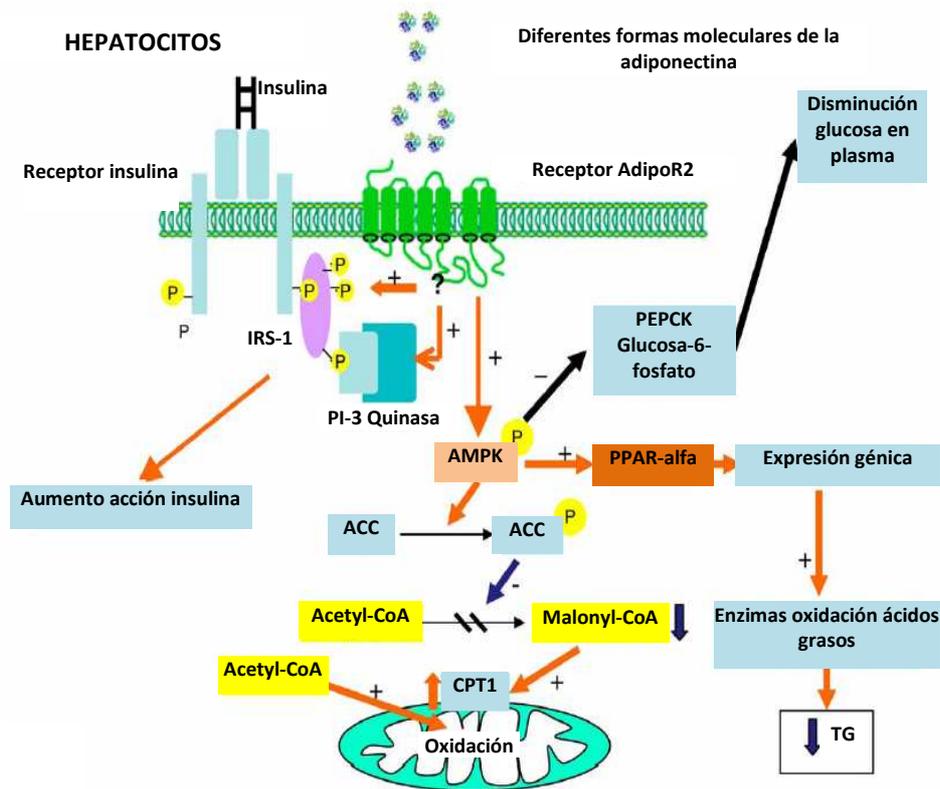


Figura 7: Modelo de acción de la adiponectina en el hígado. ACC: Acetil-CoA carboxilasa; AMPK: quinasa dependiente de AMP; CPT1: Carnitina palmitoil transferasa 1; Glucose-6-Pase: Glucosa-6- fosfatasa; GLUT4: Transportador de glucosa 4; IRS-1: sustrato del receptor de insulina-1; PI-3 kinase: fosfatidil inositol 3-quinasa; p38MAPK: quinasa p38 activada por mitógeno; PEPCK: fosfoenol piruvat carboxilasa; PPAR: receptor activador de la proliferación de los peroxisomas; TG: triglicéridos. (Adaptado de Gil-Campos y cols 2004)

La adiponectina también puede tener efectos autocrinos, y se ha descrito que en el tejido adiposo puede regular positivamente la acción de la lipoprotein-lipasa 1 (LPL-1), por lo que aumenta el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (PRTG)(16, 17).

## 1.1.4 Enfermedades asociadas a alteraciones de la adiponectina

### 1.1.4.1 Obesidad

#### 1.1.4.1.1 La obesidad infantil

La obesidad, es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial que suele iniciarse en la infancia y la adolescencia. La obesidad infantil, al igual que la del adulto, ha experimentado un incremento progresivo en los últimos treinta años en todos los

países desarrollados(18; 19). Por este motivo, la obesidad fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1998 la epidemia del siglo XXI. El incremento de la prevalencia de la obesidad infantil desde el punto de vista sanitario conlleva un incremento del riesgo de padecer patologías asociadas en la edad adulta, principalmente cardiovasculares y endocrino-metabólicas(20; 21), y, por tanto, comporta una gran carga sociosanitaria.

La valoración cuantitativa de la grasa corporal en el niño y adolescente se efectúa mediante el empleo de dos estrategias diferentes: estimación (valoración de parámetros antropométricos: peso, talla, índice e masa corporal (IMC) e índice cintura-cadera) o medición directa utilizando técnicas específicas como densitometría e impedancia bioeléctrica.

De todos los métodos citados anteriormente, el IMC es el más utilizado. En adultos se establece el valor normal de IMC entre 20 y 25 kg/m<sup>2</sup>, considerando la existencia de sobrepeso cuando IMC se encuentra entre 25 y 29,9 kg/m<sup>2</sup> y obesidad cuando es igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup>. En cuanto a la población infanto-juvenil, los puntos de corte están dificultados por las características de crecimiento y desarrollo propias de este periodo, que impiden la definición de valores absolutos de peso, talla e IMC. Por ello se comparan estos parámetros del niño con valores de referencia en función de la edad, sexo y población a la que pertenece y se expresan como valor z de peso, talla e IMC.

La evolución del valor z del IMC refleja las etapas del desarrollo del tejido adiposo infantil: al nacimiento hay un incremento rápido del tejido adiposo durante el primer año de vida, seguido de una disminución hasta los 6 años y de nuevo un incremento conocido como rebote adiposo que tiene lugar a partir de los 6 años de

edad. La edad de inicio de este rebote adiposo parece ser el mejor marcador de obesidad en la edad adulta. Cuanto más precoz es este rebote, mayor es el riesgo de sufrir obesidad o alguna de sus comorbilidades asociadas en la edad adulta(18). Además hay estudios longitudinales que sugieren que la obesidad infantil, después de los 3 años de vida, se asocia a largo plazo con un mayor riesgo de obesidad en la edad adulta y con un aumento de las enfermedades asociadas, tales como, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares(20).

#### **1.1.4.1.2 Adiponectina y obesidad**

La obesidad se define como una sobrecarga adipocitaria o exceso de grasa corporal, manifestada por un exceso de peso o volumen corporal(18). Tal como se ha comentado anteriormente, la adiponectina es sintetizada mayoritariamente por los adipocitos, por lo que se podría esperar que cambios en la masa de tejido adiposo corporal produzcan cambios en la cantidad de adiponectina circulante. Sin embargo, y a diferencia de otras hormonas sintetizadas por el tejido adiposo, la cantidad de adiponectina sérica y su expresión están paradójicamente disminuidas en condiciones de obesidad(22; 23). Además, esta relación inversa entre la concentración de adiponectina circulante y la grasa corporal se observa también en individuos con baja o casi nula grasa corporal, como las personas con anorexia nerviosa, que muestran niveles elevados de adiponectina(24; 25). Diferentes estudios poblacionales demuestran también una relación inversa entre la expresión de ARNm de adiponectina o sus niveles séricos y el IMC(23; 26). Esta correlación inversa es todavía más sólida si se realiza entre la cantidad de adiponectina y la cantidad de grasa corporal determinada mediante impedancia bioeléctrica o tomografía computerizada(27).

Estudios en primates sugieren que la adiponectina circulante disminuye con la ganancia de peso a medida que el animal se va haciendo obeso(28). Esta situación es reversible, ya que la pérdida significativa de peso produce un incremento en la expresión de adiponectina, tal como se ha observado en pacientes humanos tras someterse a cirugía bariátrica(29-31). Además, esta recuperación de la concentración de adiponectina circulante va acompañada de una mejoría de la sensibilidad a la insulina(29). De la misma manera, los niveles de adiponectina circulante, así como la sensibilidad a la insulina, pueden incrementar en personas obesas que se someten a un control estricto de la dieta(32; 33).

### **1.1.4.1.3 Adiponectina y distribución de la grasa corporal**

Estudios realizados en biopsias de tejido adiposo subcutáneo y visceral han demostrado diferencias significativas entre estos dos reservorios de grasa en cuanto a la expresión de proteínas relacionadas con el síndrome metabólico(34; 35).

Por lo que respecta a las concentraciones de adiponectina en sangre, se ha observado que también se relaciona de manera inversa con la grasa abdominal(36; 37). Concretamente, se ha sugerido que la adiponectina circulante se correlaciona mejor con la grasa visceral que con la subcutánea. Análisis *ex vivo* del tejido adiposo de sujetos delgados y obesos demuestran que hay niveles más bajos de adiponectina y de su ARNm en el tejido adiposo visceral en comparación con el subcutáneo(38; 39). Esto sugiere que no es exclusivamente la cantidad de grasa corporal, sino su distribución, la que puede determinar los niveles de adiponectina.

Por este motivo, la caracterización de las diferencias en cuanto a la secreción de adiponectina total y de APM respecto a los diferentes reservorios de grasa es

realmente importante en el contexto de la obesidad, ya que la adiposidad visceral, más que la subcutánea, se asocia con un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares(40). Los cambios en las concentraciones de adiponectina en la obesidad y su relación con los diferentes depósitos de grasa corporal están bien caracterizados en población adulta, pero los estudios en pediatría son escasos.

### 1.1.4.2 El síndrome de la resistencia a la insulina

#### 1.1.4.2.1 La resistencia a la Insulina

Se define como resistencia a la insulina al estado patológico en el que el organismo es incapaz de responder de manera normal a las acciones de la insulina,

haciendo que se necesite más insulina de la normal para mantener unos niveles de glucosa saludables en sangre(41). Sobre todo, se basa en la inhabilidad del músculo y del tejido adiposo para captar glucosa y la inhabilidad del hígado para suprimir la formación de glucosa en respuesta a concentraciones crecientes de insulina (Figura 8)(42).

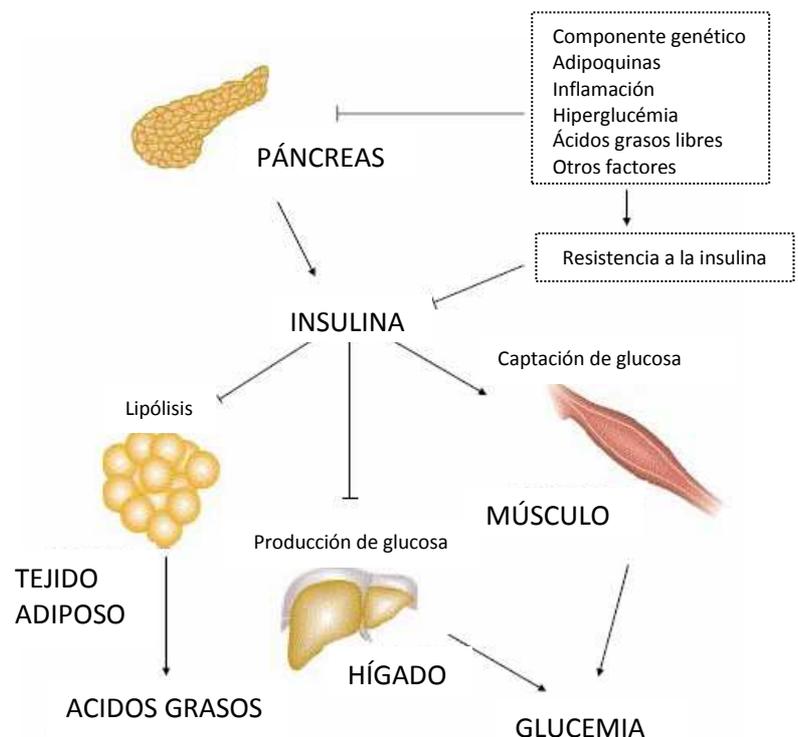


Figura 8: Principales tejidos implicados en el metabolismo glucolipídico regulado por insulina, con implicaciones en la etiopatogenia de la resistencia a la insulina. (Adaptado de Stumvoll, M. 2005)

La insulina desencadena respuestas metabólicas pleiotrópicas, uniéndose y activando a un receptor específico de la membrana plasmática, con actividad tirosina-quinasa(11). Los sustratos de este receptor, principalmente las proteínas IRS (*insulin receptor substrate*), son fosforilados en sus residuos de tirosina de forma que servirán como anclaje de proteínas adaptadoras que activarán distintas rutas de señalización (Figura 9). Alteraciones en la regulación de uno o varios puntos de esta ruta de señalización actuarían como factores desencadenantes de la resistencia a la insulina.

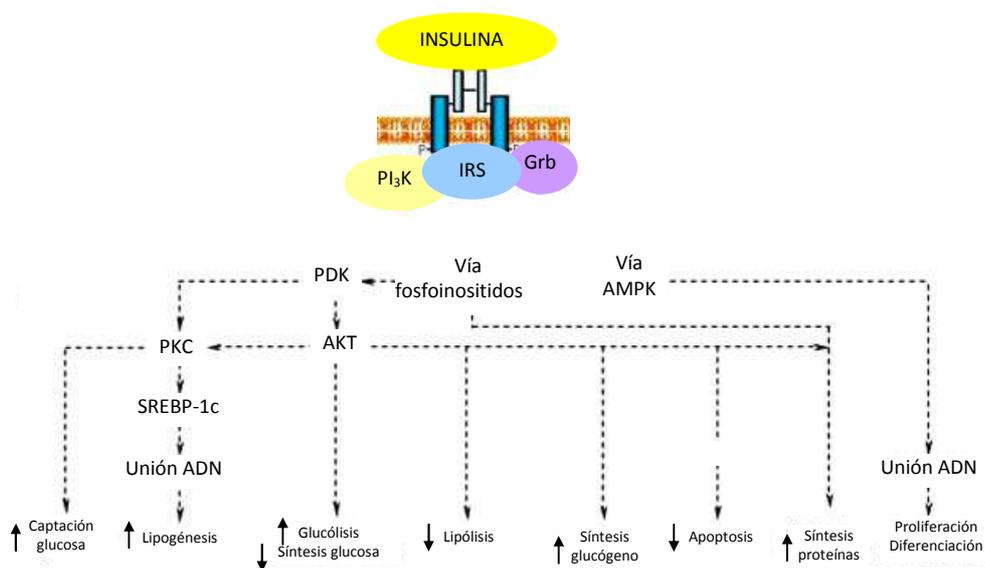


Figura 9: Esquema de las principales acciones de la insulina. (Adaptado de Buqué, X. 2008)

Se sabe que un exceso de tejido adiposo altera la expresión de ciertas proteínas con función endocrina. La expresión alterada provoca efectos perjudiciales en los tejidos periféricos sensibles a la insulina, induciendo o contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina. Se ha propuesto también la hipótesis de que la ausencia de compartimentos especializados en el almacenamiento de lípidos o bien, su deficiencia, podría estar asociada con formas graves de resistencia a la insulina(42).

La asociación tan estrecha entre la obesidad y la resistencia a la insulina y su progresión hacia la diabetes tipo 2 (cuando la secreción de insulina no puede

compensar la resistencia a la insulina en tejidos periféricos) es un grave problema de salud. La identificación de los factores que contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina es el primer paso para establecer las bases moleculares de esta alteración metabólica.

#### **1.1.4.2.2 Adiponectina y resistencia a la insulina**

Se ha postulado que la adiponectina estimula la sensibilidad a la insulina disminuyendo la producción hepática de glucosa y mejorando la regulación de la glucemia(43). Además, la hipoadiponectinemia se ha asociado en humanos con la resistencia a la insulina, independientemente de la obesidad(26; 27; 44) y con la diabetes tipo 2(45). Estos datos sugieren que la hipoadiponectinemia contribuye a los cambios en la regulación de la homeostasis de la glucosa y al descenso de la sensibilidad hepática a la insulina observada durante la diabetes.

Existen diversos estudios genéticos que confirman la relación anterior mencionada. Concretamente, se han asociado diferentes polimorfismos en el gen de la adiponectina que provocan hipoadiponectinemia con el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes, hecho que demuestra que el locus que codifica la adiponectina se asocia con la diabetes(46). Además, estudios más recientes demuestran que niveles bajos de adiponectina predicen el riesgo de padecer diabetes tipo 2(47; 48), mientras que estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que la insulina disminuye los niveles de adiponectina(49-53). Estos datos sugieren que la hiperinsulinemia podría tener un impacto negativo en los niveles de adiponectina. Sin embargo, estudios en primates indican que el descenso en los niveles de adiponectina precede al desarrollo de hiperinsulinemia(28) hecho que indica que la adiponectina puede ser una causa y no

una consecuencia de la hiperinsulinemia. Son necesarios, no obstante, más estudios para poder determinar la importancia de la adiponectina en relación a la resistencia a la insulina en edades precoces de la vida.

### **1.1.4.3 Riesgo Cardiovascular**

#### **1.1.4.3.1 Enfermedad coronaria**

En las sociedades occidentales, la enfermedad cardiovascular arteriosclerótica es una de las primeras causas de muerte en los adultos y se asocia fuertemente con el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2(54). Actualmente, la obesidad pediátrica, sobre todo la androide, se asocia a un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular, tanto en hombres como en mujeres.

El riesgo coronario depende tanto de la intensidad como de la duración de la sobrecarga adiposa central, es decir, los adultos obesos androides, que ya lo eran en su infancia, presentan más riesgo coronario que aquellos que eran delgados(18).

#### **1.1.4.3.2 Adiponectina y enfermedad coronaria**

Existen también evidencias de que la adiponectina tiene un efecto protector del desarrollo de aterosclerosis. Ratones que carecen del gen de la adiponectina presentan un mayor engrosamiento de la neoíntima de la carótida(55). Además, en ratones apoE<sup>-/-</sup>, que presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar aterosclerosis, la expresión de adiponectina exógena disminuye la susceptibilidad de desarrollar dicha enfermedad(56). Estudios *in vitro* postulan que los efectos protectores de la adiponectina serían debidos a su capacidad para disminuir los factores de adhesión vascular en las células endoteliales(57).

Además, la adiponectina podría tener efectos anti-aterogénicos a través de la modulación del metabolismo lipídico. Estudios clínicos demuestran que los niveles de adiponectina están correlacionados negativamente con los niveles en sangre de triglicéridos y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y positivamente con las lipoproteínas de alta densidad (HDL)(58; 59). Además, estudios poblacionales demuestran que la relación de la adiponectina con los lípidos en sangre es independiente de edad, género, IMC y sensibilidad a la insulina(36; 60; 61). El mecanismo por el cual la adiponectina puede regular la concentración de lípidos circulantes es desconocido, aunque, en parte, puede estar relacionado con sus efectos directos en el hígado y en el tejido adiposo.

## **1.2 El tejido adiposo**

Clásicamente, el tejido adiposo ha sido considerado como un tejido de almacenamiento de energía debido a su gran capacidad de captar ácidos grasos libres del torrente circulatorio y acumularlos en forma de triglicéridos. Los estudios de este tejido se han centrado en determinar su relación con el metabolismo y almacenamiento de ácidos grasos, el desarrollo del propio tejido y su respuesta a señales endocrinas y neuronales. No obstante, ya desde los años 40, se hipotetiza sobre la existencia de una comunicación entre el tejido adiposo y otros tejidos. Durante la última década se han identificado diferentes proteínas secretadas por los adipocitos que actúan sobre otros tejidos(62).

### **1.2.1 Características del tejido adiposo**

El tejido adiposo está formado por adipocitos y tejido conectivo altamente vascularizado e innervado donde encontramos preadipocitos, macrófagos, células

endoteliales, fibroblastos y leucocitos. La composición multivariada del tejido adiposo hace que sea un importante mediador en el metabolismo y en la inflamación. Su localización es mayoritariamente en la región subcutánea (tejido adiposo subcutáneo) y alrededor de las vísceras (tejido adiposo visceral)(62).

Las células específicas del tejido adiposo, los adipocitos, presentan la capacidad de acumular ácidos grasos en forma

de triglicéridos, cuando hay un exceso de energía, y de liberarlos en caso de necesidad energética. Para llevar a cabo estas acciones, los adipocitos contienen todos los enzimas necesarios para la lipólisis y la lipogénesis, como la sintasa de ácidos grasos (FASN). Con la acumulación de energía, el tejido adiposo se va expandiendo. Los

adipocitos secretan agentes proinflamatorios que promueven la inflamación sistémica. Además, los adipocitos hipertrofiados con alto contenido lipídico mueren y liberan su contenido en el medio exterior, lo cual facilita el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos. En pacientes obesos, este reclutamiento de macrófagos resulta en una inflamación crónica de alto grado (Figura 10)(62).

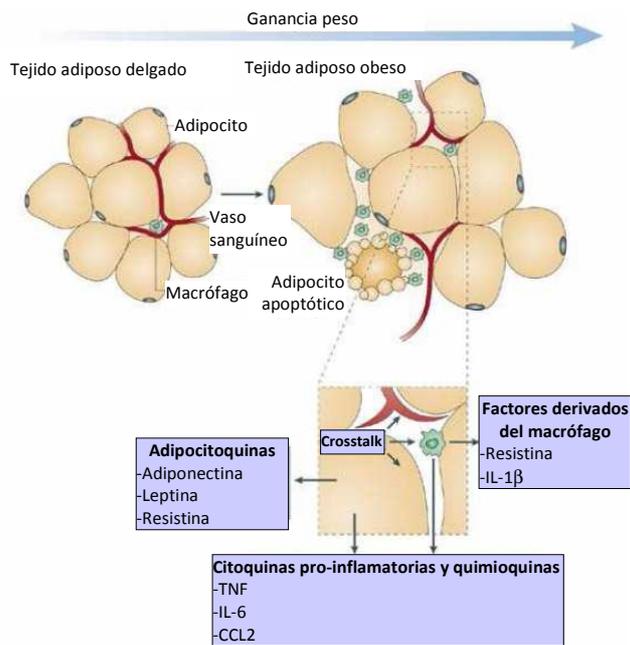


Figura 10: Consecuencias del aumento de tejido adiposo en pacientes obesos. (Adaptado de Tilg, H. 2006)

## 1.2.2 Tejido adiposo como órgano endocrino

Recientemente se ha descrito que el tejido adiposo no sólo responde a nutrientes, señales hormonales y neuronales, sino que también produce y secreta determinadas hormonas (Figura 11). Este hecho hace que se considere como un órgano endocrino pudiendo actuar sobre otros tejidos(63).

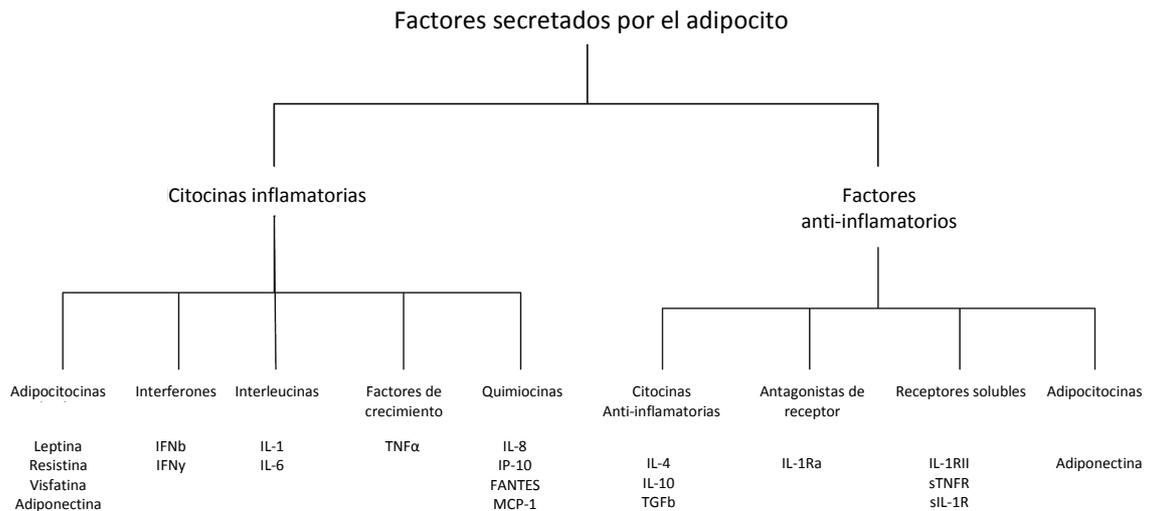


Figura 11: Factores inflamatorios y anti-inflamatorios secretados por el tejido adiposo. (Juge-Aubry, CE. 2005)

Mediante estas señales moleculares, el adipocito participa en la regulación de múltiples funciones celulares y se comunica con las células de otros tejidos localizados en órganos distantes, como el hipotálamo, el páncreas, el hígado, el músculo esquelético, los riñones, el endotelio y el sistema inmunitario (Figura 12). Una de las hormonas más importantes secretada por el tejido adiposo es la leptina, hormona reguladora del apetito(62). No obstante, hay otras adipoquinas importantes expresadas y secretadas por el mismo tejido adiposo. Éstas son: la adiponectina, visfatina, apelina, vaspina, hepcidina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), chemerina, omentina, quimiotaxina de macrófagos (MCP-1), la proteína activadora del plasminógeno (PAI) y la FASN(63).

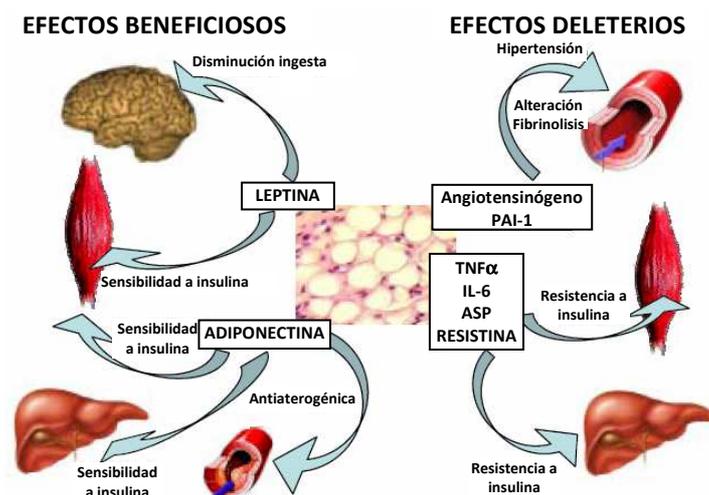


Figura 12: Factores secretados por el tejido adiposo implicados en la homeostasis energética, sensibilidad a la insulina y la homeostasis vascular. (Hidalgo, A. 2006)

### 1.2.3 Sintasa de ácidos grasos y metabolismo energético

La sintasa de ácidos grasos o FASN es un complejo multienzimático presente principalmente en las células del tejido adiposo, que juega un papel central en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos. Los ácidos grasos son ácidos alifáticos fundamentales para la producción y el almacenamiento de energía, así como la formación de estructuras celulares, hormonas y como anclaje de proteínas de membrana(64).

La expresión de FASN está controlada principalmente por señales nutricionales. Por este motivo, en células normales, los niveles de expresión de FASN son relativamente bajos, debido a que, generalmente, los ácidos grasos son proporcionados por la dieta. No obstante, FASN juega un importante papel en el metabolismo energético en tejidos lipogénicos como el hígado, el tejido adiposo, las mamas y el endometrio(64). Diversos estudios han relacionado FASN con el contenido de grasa corporal(65-67) y la resistencia a la insulina(68).

Estudios recientes han demostrado que las células también pueden excretar FASN al espacio extracelular(69-71). Se cree que esta forma extracelular de FASN refleja la actividad de FASN intracelular previa(72). Además, algunos autores han hipotetizado que las concentraciones de FASN circulante pueden representar una característica común en enfermedades humanas que involucran alteraciones en la regulación del metabolismo energético, tales como la obesidad y el cáncer(68; 73; 74).

La excreción de FASN al medio extracelular es un proceso activo y controlado que se cree que tiene lugar a través de la estimulación de la quinasa activada por AMP (AMPK)(72). La AMPK es una molécula clave extremadamente sensible a los niveles de energía(75-77). Cuando se activa la molécula AMPK, ésta fosforila a varias dianas, que incluyen diversas enzimas anabólicas, hecho que inhibe la actividad de FASN y conlleva a la supresión del consumo de energía y de la producción de lípidos. Por lo tanto, AMPK no solo inhibe la producción lipídica al inhibir la fosforilación e inactivación de la acetil-CoA carboxilasa (ACACA)(78), el primer enzima en la biosíntesis endógena de ácidos grasos, sino que también aumenta la excreción de FASN desde el citosol celular(72).

Aunque tanto la adiponectina de alto peso molecular como la FASN se expresan y secretan en el mismo tejido, no se conocen estudios que hayan analizado la relación entre ambas moléculas.

### **1.3 El eje tiroideo**

El tiroides es una glándula neuroendocrina formada por dos lóbulos en forma de mariposa que está situada en la parte frontal e inferior del cuello (Figura 13) y que está regulada por la hipófisis y el hipotálamo(79; 80).

### 1.3.1 Características principales

El tiroides se reconoció como órgano de importancia cuando se observó que el agrandamiento y la atrofia, o hipofunción, del tiroides estaban estrechamente

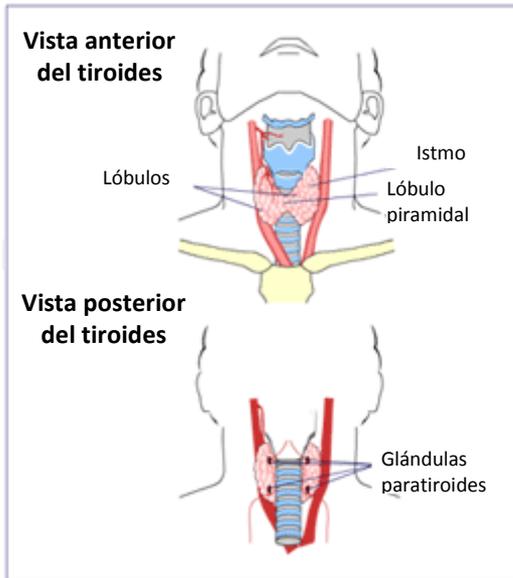


Figura 13: Esquema donde se muestra la localización del tiroides. (Pitoia, F. 2006)

relacionados con una serie de alteraciones metabólicas. Estos síntomas hoy día caracterizan a los pacientes con hipertiroidismo o hipotiroidismo, respectivamente(81; 82). En 1961, gracias al descubrimiento de la calcitonina, se observó que el tiroides también juega un papel importante en la homeostasis del calcio(83).

La unidad básica del tiroides es el folículo, el cual está constituido por células cuboidales que producen y rodean el coloide, cuyo componente fundamental es la

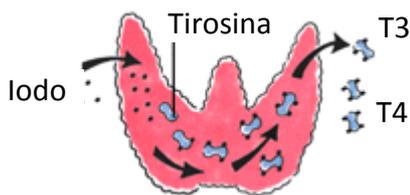


Figura 14: Formación de hormonas tiroideas en el coloide.

tiroglobulina, la molécula precursora de las hormonas tiroideas; triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) (Figura 14). La síntesis hormonal está regulada enzimáticamente y precisa de un

oligoelemento esencial, el yodo, que se obtiene de la dieta en forma de yoduro. El yodo se almacena en el coloide y se une a fragmentos de tiroglobulina para formar T3 o T4 (Figura 15). Cuando la concentración de yodo es superior a la requerida se inhibe la formación tanto de T3 como de T4, fenómeno conocido como efecto Wolff Chaikoff(79). En seres humanos en desarrollo, estos compuestos son esenciales para el desarrollo normal, especialmente para el sistema nervioso central(84). En adultos, las

hormonas tiroideas ejercen un papel importante en la homeostasis metabólica, al afectar la función de casi todos los sistemas(79).

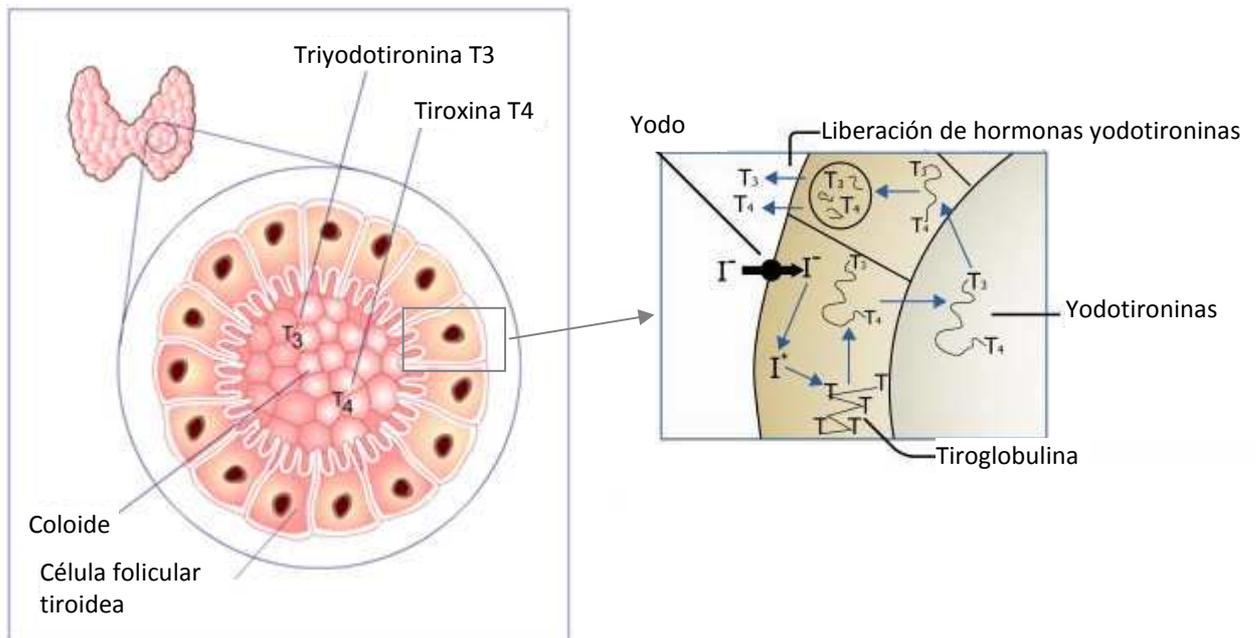


Figura 15: Representación de las partes de la glándula tiroidea donde se puede observar la producción y secreción de las hormonas tiroideas. (Pitoia, F. 2006)

### 1.3.2 Hormonas tiroideas

La tirotrópica (TSH), denominada también hormona estimulante del tiroides u hormona tireotropa, es una hormona producida por la hipófisis que regula la producción de hormonas tiroideas.

La secreción de tirotrópica está controlada por un factor regulador hipotalámico denominado hormona liberadora de tirotrópica (TRH), tripéptido secretado por el hipotálamo(85-87). El aumento de la tirotrópica en sangre inhibe la secreción de TRH por la hipófisis anterior, principalmente debido a un efecto de retroalimentación negativa directa de esta glándula. El efecto del mecanismo de retroalimentación pretende mantener en la circulación una concentración casi constante de hormonas tiroideas (Figura 16)(79).

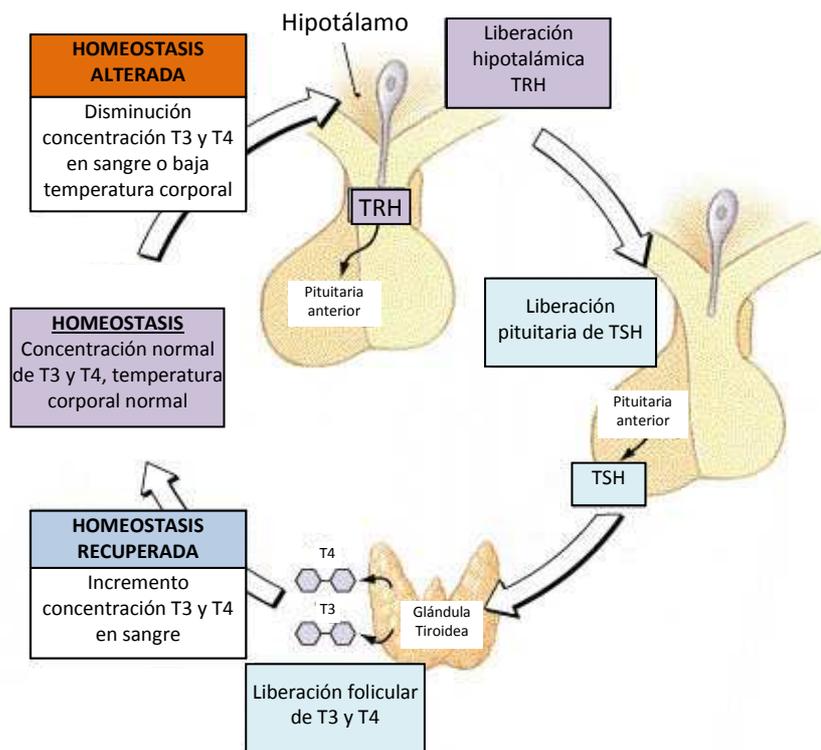


Figura 16: Esquema del mecanismo de retroalimentación de la TSH. (Adaptado de Zoe 2006)

La TSH produce varios efectos sobre la glándula tiroidea, pero el más importante es el aumento de la secreción de tiroxina y triyodotironina(88; 89).

La tiroxina, también llamada tetrayodotironina (T4), es una importante hormona tiroidea compuesta por la unión de dos residuos de aminoácido yodados. Su función es estimular el metabolismo de los hidratos de carbono y grasas, activando el consumo de oxígeno, así como la degradación de proteínas dentro de la célula. La T4 necesita ser convertida a triyodotironina (T3) por la yodotironina deyodinasa tisular para ejercer su acción biológica(90; 91). La T4 constituye el 93% de la hormona tiroidea circulante, mientras que la T3 suponen tan solo el 7%(92).

Las hormonas tiroideas se transportan en sangre fuertemente asociadas, pero no de manera covalente, con proteínas plasmáticas. La globulina transportadora de tiroxina (TBG) es el principal transportador de hormonas tiroideas. No obstante, la

prealbúmina y la albúmina también pueden servir como transportadoras de la tiroxina en caso que otras más competentes estén saturadas(93; 94). La unión de las hormonas tiroideas a las proteínas plasmáticas protege a las hormonas de su degradación, y por esta razón sus vidas medias en circulación son largas. Las hormonas tiroideas se degradan principalmente en el hígado y pueden ser excretadas por la bilis, ser reabsorbidas en el intestino o bien ser eliminadas por las heces(88).

### **1.3.3 Relación entre el eje tiroideo y parámetros endocrino-metabólicos**

Es conocido que las hormonas tiroideas juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis energética(95). Pueden estimular la expresión de varias proteínas tanto en el tejido adiposo como en las células del músculo esquelético(96-98). Además, en individuos eutiroideos, estudios poblacionales han demostrado correlaciones negativas entre la T4 libre en suero y el IMC o la circunferencia de la cadera, así como asociaciones positivas entre la TSH y el IMC(99; 100). Las hormonas tiroideas afectan también al peso corporal, la distribución de la grasa y la aparición de la obesidad. Además, estudios previos en ratones y humanos aportan evidencias de que las hormonas tiroideas podrían estar implicadas en la regulación de la expresión y/o secreción de la adiponectina(52; 101; 102), pero los resultados de estos estudios son escasos y conflictivos, por lo que el mecanismo molecular de dicha relación aún no esté claro(103-105).

## **1.4 El tejido óseo**

El hueso es un tejido conjuntivo especializado de cierta elasticidad, ligero y de gran dureza, que juntamente con el cartílago constituyen el esqueleto. En los

vertebrados, este tejido efectúa una triple función: la de sostener el cuerpo y posibilitar el movimiento, la protección de órganos vitales y la función de reserva de iones calcio y fosfato(106).

### 1.4.1 Características principales

Los constituyentes principales del hueso son las células especializadas y la matriz extracelular. La parte celular del hueso la forman básicamente tres tipos de células: los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos. Esta parte es conocida como el componente orgánico del hueso. El componente inorgánico está constituido por calcio y fosfato en forma de cristales de hidroxapatita que confiere la dureza característica del tejido óseo. La membrana del tejido conjuntivo que envuelve el hueso recibe el nombre de periostio y es fundamental para la formación de este tejido(107).

La matriz extracelular juega un papel muy importante en la transmisión de la fuerza y el mantenimiento de la estructura ósea(108). La proteína más abundante de la matriz y uno de los mayores constituyentes implicados en la mineralización ósea es el colágeno tipo I (representa un 90% de las proteínas totales)(107; 109). El colágeno tipo I es abundante en la dermis, el hueso, el tendón, la dentina y la córnea. Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, que se agrupan para formar fibras colágenas de mayor peso molecular. El colágeno tipo I

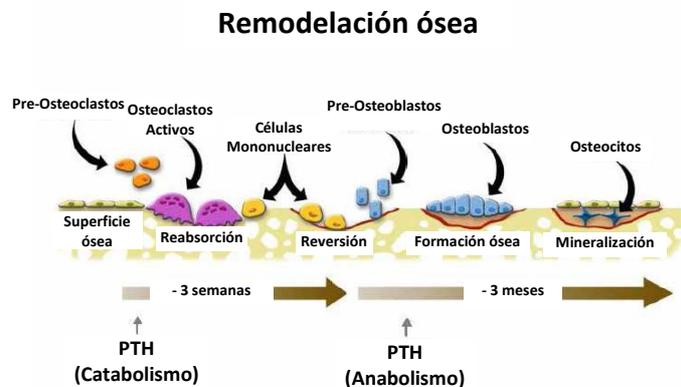


Figura 17: Esquema de la remodelación ósea. (Bone remodeling cycle, University of Michigan, 2005)

es sintetizado por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos(110-114).

Las funciones del tejido óseo son posibles gracias a la constante renovación de este tejido, conocida como remodelación ósea (Figura 17). Este complejo y costoso proceso presenta funciones de supervivencia y es considerado como una función clave para preservar la movilidad y la masa ósea constante a lo largo de la vida(115). El componente que realiza esta importante función es la parte celular. Los osteoclastos son los encargados de la reabsorción ósea, mientras que los osteoblastos se encargan de la reconstrucción del hueso reabsorbido. Los osteoblastos tienen la función de elaborar grandes cantidades de matriz extracelular ósea que más tarde será mineralizada. Gracias al equilibrio entre la reabsorción ósea osteoclástica y la formación osteoblástica controlada por mecanismos autocrinos y paracrinos locales, la masa ósea y la estructura normal del hueso se mantienen constantes a lo largo de la vida(106; 115). Cuando la remodelación ósea se altera por un desequilibrio entre estos dos procesos, se producen alteraciones óseas como la osteoporosis o la osteopetrosis, entre otras.

#### **1.4.2 Marcadores óseos**

Los marcadores óseos o marcadores bioquímicos de remodelado óseo son enzimas u otras proteínas secretadas por los osteoblastos, osteoclastos o bien sustancias producidas durante la formación o la degradación del colágeno tipo 1. Estas proteínas son liberadas al torrente sanguíneo pudiendo ser cuantificadas posteriormente en sangre y/o orina para determinar el metabolismo óseo de cada individuo. Los marcadores relacionados con los osteoblastos y que reflejan la actividad osteoblástica, se conocen como marcadores de formación. Mientras que a los

marcadores relacionados con los osteoclastos se les denomina marcadores de reabsorción(116).

Los marcadores de formación ósea que se estudiarán en este trabajo son: la osteocalcina y la fosfatasa alcalina ósea, mientras que el marcador de resorción ósea será el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1 o  $\beta$ -CrossLaps ( $\beta$ -CTX) (Figura 18).

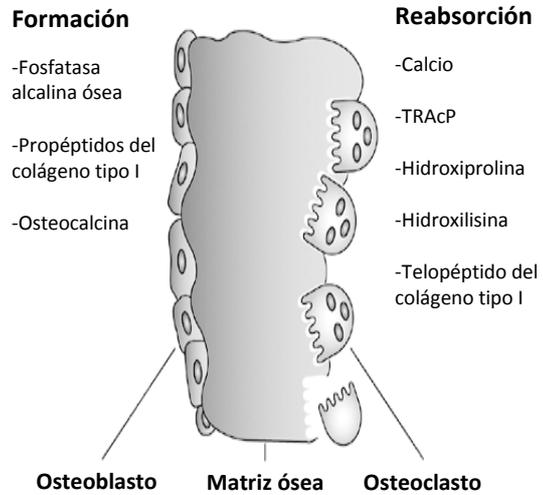


Figura 18: Marcadores bioquímicos de la reabsorción ósea. (Adaptado de Seibel, M. 2006)

**1.4.2.1 La osteocalcina**

La osteocalcina (OC), también conocida como proteína ósea Gla o proteína ácida  $\gamma$ -carboxiglutámica del hueso (BGP)(117; 118), es una de las proteínas no colágenas más abundantes de la matriz ósea. La OC es sintetizada principalmente por los osteoblastos durante el proceso de remodelación ósea. Presenta un peso molecular aproximado de 5,8 kDa y consta de 49 aminoácidos. Se caracteriza por la presencia de tres residuos ácido carboxiglutámicos gamma (Gla) en las posiciones 17, 21 y 24(119) (Figura 19), responsables de su alta afinidad por la hidroxiapatita del hueso.

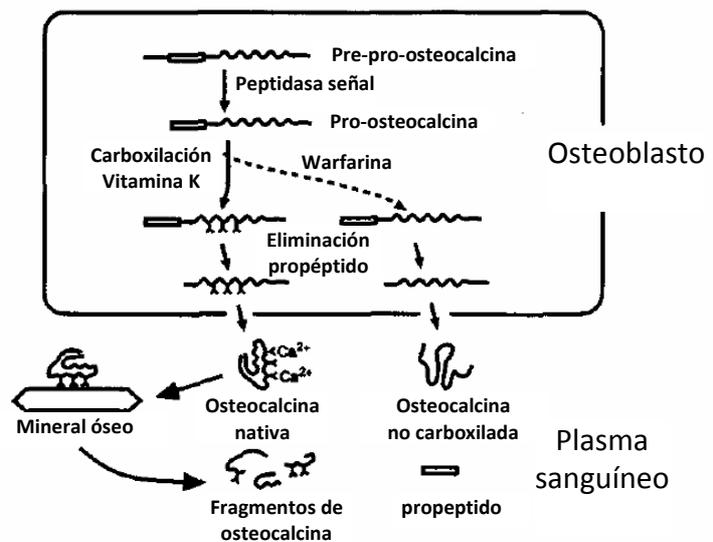


Figura 19: Esquema de las modificaciones postraduccionales de la OC. (Adaptado de Robins, S. 1993)

El gen de la OC en el humano se localiza en el cromosoma 1q25-q31(120). La síntesis de OC depende tanto de la vitamina D como de la vitamina K. La vitamina D 1,25-dihydroxy-D(1,25(OH)<sub>2</sub>D) induce directamente la síntesis de osteocalcina, a través de una regulación transcripcional mediante el receptor nuclear de vitamina D(119; 121), mientras que la vitamina K actúa como cofactor esencial en la carboxilación de la OC. Esta modificación post-traducciona consiste en la adición de residuos glutamil en las posiciones 17, 21 y 24, lo cual provoca un cambio conformacional que estabiliza la proteína y le confiere afinidad por el calcio y la hidroxiapatita del hueso. Cuando la molécula de OC está carboxilada se conoce como OC carboxilada (OCc) y cuando la molécula de OC no está carboxilada se conoce como OC descarboxilada (OCdc)(119). La OCdc, al no poseer las tres posiciones carboxiladas, no tiene afinidad por la hidroxiapatita del hueso y es liberada a la circulación. El resultado, son unos huesos deficientes de OC, lo cual se asocia a fragilidad ósea y un incremento del riesgo de sufrir fracturas(119; 121).

En animales de experimentación, se ha observado que la OCdc mejora la secreción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas, y mejora así la sensibilidad a la insulina(122). Estudios clínicos en población adulta son compatibles con los resultados en animales(123-126), pues relacionan la OC con una disminución de la cantidad de masa grasa y con el metabolismo de la glucosa, y con una disminución de la severidad de la obesidad y la diabetes tipo 2(127; 128). Se ha descrito que parte de los efectos positivos de la OC en el metabolismo son mediados por la estimulación de la secreción de adiponectina en los adipocitos(129; 130).

### **1.4.2.2 Fosfatasa alcalina ósea**

La fosfatasa alcalina ósea es una enzima localizada en la membrana celular externa de los osteoblastos que es fundamental para la formación del osteoide y la mineralización de la matriz ósea(131; 132). Su principal función es la de hidrolizar fosfomonoesterasas en un medio alcalino(133), para originar un radical orgánico y otro fosfato inorgánico, con el fin de que este último se pueda unir al calcio para formar los cristales de hidroxiapatita.

La fosfatasa alcalina ósea junto con la hepática intestinal y la placentaria forman la fosfatasa alcalina total(134). La importancia clínica de la fosfatasa alcalina ósea es que es un marcador de actividad osteoblástica, que se encuentra elevada durante la infancia y la adolescencia, debido al crecimiento, y en fracturas óseas y enfermedades malignas óseas.

### **1.4.2.3 Telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1**

La degradación de la matriz ósea es esencial para que se produzca el remodelado óseo. Dos tipos de enzimas proteolíticas se encuentran involucradas en dicho proceso, la catepsina K lisosomal y las metaloproteínas de la matriz (MMPs), cuya actividad depende del estado de remodelamiento y del tipo de hueso a ser remodelado(135).

Actualmente se considera que la catepsina K, cuya actividad es máxima a pH ácido, es la principal colagenasa del proceso de resorción ósea. Esta enzima es capaz de degradar el colágeno en varios sitios para dar lugar a pequeños péptidos N- y C-terminales, y dejar expuesta la molécula de colágeno a otras colagenasas que actúan a pH neutro, entre ellas las MMPs (Figura 20)(136).

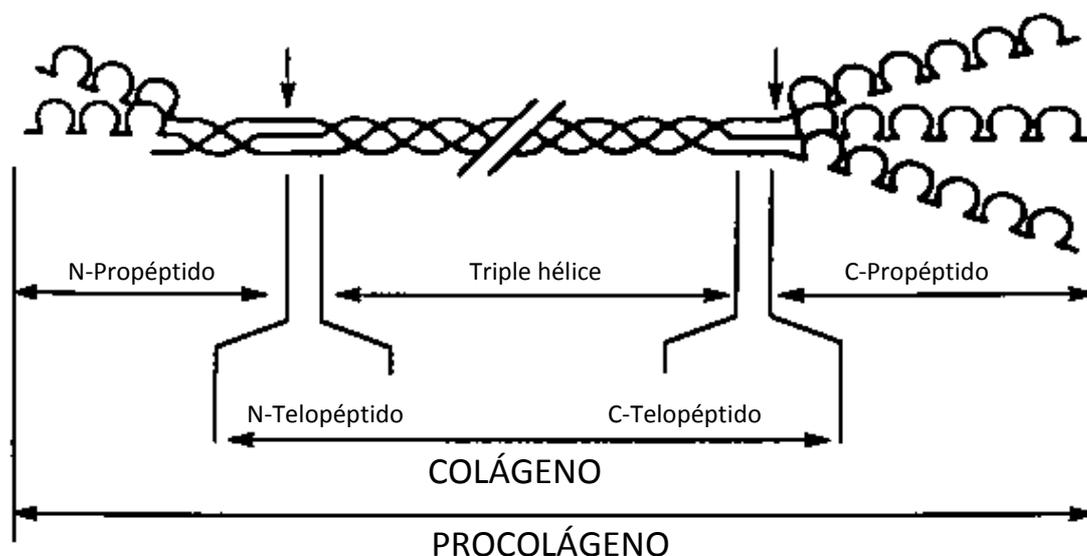


Figura 20: Representación de la formación del CTX (C-Telopéptido) (Adaptado de Zeni, S. 2001)

Por este motivo, se considera en la actualidad que los telopéptidos N- y C-terminal, conocidos como NTX y CTX, respectivamente, son los marcadores más sensibles y específicos de la resorción ósea. Estos fragmentos se forman por la actividad de la catepsina K y aparecen en cantidades significativas, tanto en sangre como en orina, donde pueden medirse por inmunoensayos específicos(137; 138). La medición sérica proporciona una ventaja con respecto al ensayo en orina porque evita el efecto aditivo de la variabilidad biológica de la excreción de creatinina urinaria(139).

### 1.4.3 Relación entre la adiponectina y el metabolismo óseo

Recientemente se ha implicado a la adiponectina en la regulación de la masa ósea(127). Concretamente, diversos estudios han sugerido una relación entre la masa grasa y el metabolismo óseo debido a que el aumento de la densidad mineral ósea se asocia con un incremento de la masa grasa(140).

Esta relación podría ser explicada por la presencia de receptores de adiponectina (AdipoR), tanto en el tejido óseo como en los osteoblastos(141; 142). Se ha sugerido que la unión de la adiponectina a este receptor promueve la proliferación

de los osteoblastos a través de la ruta AdipoR/JNK mientras que la respuesta de diferenciación tiene lugar a través de la ruta AdipoR/p38 AMPK(142). No obstante el mecanismo mediante el cual la adiponectina regula la fisiología ósea aún no ha sido completamente aclarado. Debido a que la adiponectina también, paradójicamente, puede tener efectos negativos sobre el hueso activando los osteoclastos mediante la estimulación del ligando de unión al receptor activador del factor nuclear- $\kappa$ B (RANKL), y la reducción simultánea de la expresión de la osteoprotegerina (OPG)(127). Además, estudios previos indican que la adiponectina puede actuar en el hueso, no sólo a través de rutas paracrinas, como hormona secretada por el tejido adiposo, sino que también a través de rutas autocrinas(143).

En este contexto, hay que reseñar la importancia de la OC, molécula ósea que recientemente se ha relacionado, no solo con una disminución de la cantidad de masa grasa(127; 128), sino también mejorando la sensibilidad a la insulina(122). Además también se ha descrito que parte de los efectos positivos de la OCdc en el metabolismo son mediados por mejoras en la secreción de adiponectina en los adipocitos(129; 130).

Estudios clínicos en población adulta dan soporte a los resultados en animales(123-126), demostrando que las asociaciones entre la adiponectina total, la OC total y la sensibilidad a la insulina en adultos dependía del IMC(126). No obstante, aún no está claro cuál es la forma molecular de la OC asociada con el metabolismo en humanos.

En resumen, las hormonas tiroideas, la osteocalcina del hueso y las concentraciones de FASN circulante están involucradas en alteraciones de la regulación del metabolismo energético(68; 73; 74; 95). En este sentido, investigadores previos han relacionado a las hormonas tiroideas y la OC con la adiponectina(52; 101-

102; 123-127), pero el mecanismo molecular de dichas relación no ha sido esclarecido(103-105). Además, los estudios en población pediátrica sobre estas asociaciones son escasos. Una mejor comprensión de la relación entre la adiponectina de APM, el eje tiroideo y el metabolismo óseo contribuirá a determinar si la adiponectina es un proteína central en la regulación del metabolismo energético.



## **2 HIPÓTESIS**



## **Hipótesis**

Se ha descrito que distintos marcadores del eje tiroideo (TSH, T3 y T4) y hueso (dcOC y cOC) pueden ser considerados como hormonas que regulan el metabolismo energético.

### **Hipótesis 1**

Proponemos que la adiponectina de APM se asocia con las hormonas tiroides y que además la tiroxina podría regular la secreción de adiponectina de alto peso molecular en el tejido adiposo.

### **Hipótesis 2**

Proponemos que la adiponectina de APM puede ser una molécula clave para explicar las asociaciones entre marcadores óseos y el metabolismo energético en la edad pediátrica.

### **Hipótesis 3**

Proponemos que la FASN soluble, como nueva molécula del metabolismo energético, puede estar relacionada con la adiponectina de alto peso molecular y estar implicada también en el metabolismo óseo.



# **3 OBJETIVOS**



## Objetivos

Estudiar la asociación entre la adiponectina de APM, el eje tiroideo, y el metabolismo óseo en etapas precoces de la vida.

Para tal fin, se ha diseñado un estudio transversal en una muestra de niños de 6 a 9 años de edad procedentes de la población general que han sido estudiados con los objetivos concretos de:

- 1) Estudiar si la adiponectina de APM se relaciona con variaciones en el rango normal de hormonas tiroideas (TSH y T4). Estudiar también si la tiroxina puede modular la expresión o la secreción de la adiponectina de APM en explantes de tejido adiposo de niños prepuberales sanos.
- 2) Estudiar las asociaciones clínicas entre la adiponectina de APM y marcadores de metabolismo óseo, principalmente con las diferentes formas de osteocalcina –OCdc y OCc-.
- 3) Estudiar la asociación entre la adiponectina de APM y FASN circulante, y analizar su relación con marcadores de metabolismo óseo.



# **4 MATERIAL Y MÉTODOS**



#### **4.1 Diseño**

Estudio clínico observacional en la población pediátrica de referencia de los Centros de Salud de *l'Alt Empordà*, región del norte de España. El diseño se basa en un análisis transversal en niños de 6 a 9 años de edad.

#### **4.2 Consideraciones éticas**

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital de Girona Dr. Josep Trueta (comité de referencia). Se recogió un consentimiento informado de los tutores legales de todos los niños incluidos en el estudio. En todo momento se respetaron los principios fundamentales de la declaración de Helsinki así como la legislación vigente sobre la confidencialidad de datos personales y las normas éticas sobre estudios clínicos en pacientes pediátricos.

#### **4.3 Sujetos de estudio**

Se estudiaron 234 niños caucásicos de edad escolar [113 niños y 121 niñas; edad  $6.8 \pm 0.1$  años], que se incluyeron en los centros de referencia durante la visita del niño sano. Esta edad nos permitió excluir a los niños puberales, pues es conocido que presentan cambios importantes en la sensibilidad a la insulina (una variable principal del estudio) durante este periodo de desarrollo.

Se considera que, para que una muestra sea representativa de la población a estudiar, es necesario una participación superior al 80%; en nuestro estudio la participación máxima fue del 50-70%. Asumimos, también que hayamos podido excluir de la muestra aquellos pacientes que solo hicieran uso de un sistema privado de atención sanitaria. En todo caso, las características antropométricas (peso, talla e

índice de masa corporal) de los niños que finalmente se incluyeron en la muestra de estudio demostraron seguir un patrón poblacional, por lo que consideramos que el posible sesgo de selección haya sido realmente bajo. Además, todos los niños estaban sanos y tenían todos los parámetros metabólicos y de función tiroidea y ósea dentro de la normalidad.

#### **4.4 Criterios de inclusión y exclusión de los sujetos**

##### **4.4.1 Criterios de inclusión:**

- Niño/a prepuberal de entre 6 y 9 años de edad de las áreas de referencia cuyos padres aceptaron que participara en el estudio.
- Ausencia de pubertad según los criterios de Tanner y Marshall(144; 145).

##### **4.4.2 Criterios de exclusión:**

- Niño/a prepuberal con enfermedad crónica grave, enfermedad crónica de carácter inflamatorio o enfermedad aguda intercurrente, consumo de corticoides, antibióticos o antiinflamatorios en los 15 días previos al estudio. En estos últimos supuestos, se retrasó la inclusión del niño hasta haber transcurrido 15 días del proceso intercurrente o del fin del uso de medicación.
- Recuento sanguíneo anormal, o con alteración de la función hepática o renal.

#### **4.5 Variables**

##### **4.5.1 Variables clínicas**

El examen clínico y la recolección de la muestra de sangre se realizaron, en todos los pacientes, entre las 8:00 y las 9:00 de la mañana en condiciones de ayuno.

El peso y la talla se midieron con la ayuda de una báscula calibrada y un estadiómetro Harpenden, respectivamente. Posteriormente se calculó el índice de

masa corporal (IMC) utilizando la fórmula  $IMC = \text{peso (kg)} / \text{talla (m}^2\text{)}$ . Se usaron datos regionales normativos para calcular los valores estándar en función del sexo y la edad de cada niño para el peso, la talla y el IMC(146). Los perímetros abdominal y pélvico se midieron a la altura del ombligo y de la pelvis, respectivamente. La presión arterial se midió en posición supina en el brazo derecho después de 10 minutos de reposo con un oscilómetro electrónico.

La composición corporal (masa grasa, masa magra y agua corporal total) se midió mediante impedanciometría electrónica (Hydra Bioimpedance Analyzer 4200, Xitron Technologies, San Diego, CA). Se trata de una técnica no invasiva que ha sido utilizada y validada en niños y las mediciones se correlacionan bien con datos de absorciometría dual de rayos X (DXA)(147).

Para la cuantificación de la adiposidad subcutánea y visceral se usó un ecógrafo de alta resolución (MyLab<sup>TM</sup>25, Firenze, Italy) con sonda convex multifrecuencia de 3.5-5 MHz y sonda lineal multifrecuencia de 8-12 MHz(148). La grasa visceral se estimó como la distancia entre la superficie interna de la pared abdominal y la pared posterior de la aorta a la altura del ombligo(149). El grosor de la grasa localizada en la pared posterior renal derecha en el espacio perirrenal también fue calculado para ser añadido a la medición de la grasa visceral, tal y como lo describió Hirooka y cols(150). Todas estas medidas se realizaron por el mismo observador. El paciente había vaciado la vejiga urinaria y estaba en posición supina. Las mediciones se realizaron por triplicado al final de la espiración con la mínima presión posible de la sonda. El coeficiente de variación intra-sujeto para las medidas de ultrasonidos fue menor del 6%. La medida de la grasa visceral mediante ultrasonidos no es invasiva, ha sido

utilizada y validada en niños y las mediciones se correlacionan bien con datos de tomografía computerizada(149; 150).

### 4.5.2 Variables analíticas

Se practicó una extracción de sangre venosa (máximo 15 ml de sangre) para la realización de una analítica general y recolección y congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  de una seroteca, plasmoteca y leucocitos circulantes.

Todas las extracciones se realizaron en un ambiente tranquilo, tras haber aplicado crema anestésica en la piel (crema EMLA, de uso habitual en pediatría) y con personal experimentado que minimizaron las molestias de la punción.

Se realizó una analítica general (hemograma, bioquímica general, glucosa, insulina y perfil lipídico) a cada niño.

La glucosa en suero fue cuantificada mediante el método de la hexoquinasa y la insulina fue medida mediante inmunoquimioluminiscencia (IMMULITE 2000, Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Los límites de detección fueron de 0.4 mIU/L y el coeficiente intra- e inter-ensayo fue menor que el 10%. Se utilizó el *Homeostasis Model Assessment* (HOMA; Matthews, 1985) para estimar la sensibilidad [HOMA-IR] y secreción [HOMA- $\beta$ ] de insulina en las muestras de suero recogidas(151). Estos parámetros han sido validados en diversas poblaciones pediátricas.

El colesterol HDL fue cuantificado utilizando el método homogéneo del detergente selectivo con acelerador. Los triglicéridos totales en suero se midieron mediante el método de la oxidasa de glicerol fosfato. Todos estos parámetros fueron analizados en una muestra fresca de suero en el analizador C-8000 de Abbot (Abbot Park, IL, US), con unos CV intra- e inter-ensayo inferiores al 10%. La TSH y la T4 libre se

midieron mediante inmunoensayos quimioluminiscentes de micropartículas (Abbot Park, IL, USA), con los respectivos límites de detección de 0.01 mIU/L y 0.4 ng/dl; los CV fueron menores del 5% y el 8%, respectivamente.

La adiponectina total y de APM se cuantificaron mediante ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISAs) tipo sándwich [Linco, St. Charles, MO (10)]. Los respectivos límites de detección fueron de 0.8 ng/ml y 0.5 ng/ml y los CV fueron menores de 4%. La OC total fue cuantificada mediante un test inmunológico enzimático (Nordic Bioscience Diagnostics a/s, Herlev, Denmark) con una sensibilidad de 0.5 ng/ml. Para la OCdc se utilizó un EIA de fase sólida (Glu-OC MK-118; Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan) basado en un método de sándwich con dos anticuerpos anti-OCdc monoclonales con una sensibilidad de 0.25 ng/ml y unos CV menores del 6%. La concentración de OCc en suero se calculó como la diferencia entre la OC total y la OCdc. La relación OCdc-OCc se usó para corregir por los cambios inversos paralelos en las concentraciones de OCc. La fosfatasa alcalina específica del hueso se cuantificó mediante un ensayo inmunoenzimático (Immunodiagnostic systems, Boldon, Tyne & Ware, UK). El límite mínimo de detección fue de 0.7 µg/L y los CV intra- e inter-ensayo fueron inferiores al 7%. El telopéptido carboxilo terminal del colágeno tipo I (CTX) se cuantificó utilizando un inmunoensayo electroquimioluminiscente (Elecsys 2010 automated analyzer, Roche). El límite mínimo de detección fue de 0.010 ng/ml y el CV intra- e inter-ensayo fue menor del 9%. FASN soluble se cuantificó mediante ELISA (FASgen, Inc, Baltimore) con una sensibilidad de 0.3 ng/ml y un CV menor del 12%. La 25-hidroxivitamina D en suero [que comprende tanto la vitamina D2 (25-OH ergocalciferol) como la D3 (25-OH colecalciferol)] fue cuantificada con un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (ARCHITECT, Abbot Diagnostics

Europe, Milan, Italy). El límite mínimo de detección fue de 1.9 ng/mL y los CV intra- e inter- ensayo fueron menores del 10%.

#### **4.6 Biopsias de tejido adiposo**

Los explantes de tejido adiposo visceral (perirrenal y epiploico) se obtuvieron de 6 niños adicionales (3 niños y 3 niñas, edad  $6.1 \pm 1.2$ ) durante una cirugía abdominal programada por malformaciones urológicas o reparación de hernias inguinales. De todos los niños se recogió el correspondiente consentimiento informado. Todos los pacientes fueron asintomáticos (libres de cualquier enfermedad aguda o crónica), con recuentos sanguíneos normales y funciones hepática y renal normales.

Las biopsias de tejido adiposo se cortaron en pequeños trozos y se lavaron con un tampón fosfato salino (PBS) con un 5% de albúmina sérica bovina (BSA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cantidades similares de tejido (aproximadamente 300 mg de tejido/pocillo) se incubaron en placas de 12 pocillos con 1 ml de medio DMEM suplementado con: 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de sodio piruvato, 1% de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomina y el vehículo de la T4 (hidróxido sódico; NaOH) o bien 1 o 10 nM de triyodotironina ( $T_3$ ) durante 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo y las biopsias de tejido adiposo se recolectaron para el estudio de proteínas totales y las concentraciones de adiponectina total y de APM, así como su expresión génica en los tiempos 0h, 6h, 12h y 24h.

Tanto la adiponectina total como la de APM se cuantificaron en el medio de cultivo usando los mismos ELISAs comerciales descritos arriba. Los resultados se ajustaron por concentraciones de proteína total en el medio de cultivo cuantificadas por el método de Lowry (1951). El ARN total del tejido adiposo se extrajo mediante el

*RNeasy Lipid Tissue Mini kit* (Qiagen Inc.), siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial, incluyendo el paso con DNAsa. Un microgramo de RNA fue retrotranscrito utilizando el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real se llevó a cabo en reacciones duplicadas de 25  $\mu$ l de *2XTaqman Universal Master Mix* (Applied Biosystems), 1.25  $\mu$ l del kit para la amplificación del gen de la adiponectina (cat. #Hs01057145 *Taqman Gene Expression Assays*) (Applied Biosystems). El gen GAPDH (cat. #HS99999910) se utilizó como gen control. Las reacciones se amplificaron en un aparato de PCR en tiempo real ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) utilizando las siguientes condiciones: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15s y 60°C durante 1 minuto. Las expresiones relativas se calcularon de acuerdo con el método del  $2^{-\Delta\text{CT}}$ . Los valores de  $\Delta\text{Ct}$  se determinaron para cada gen normalizando los valores por la mediana geométrica de los valores de Ct para el gen control GAPDH amplificado en la misma placa de PCR. La variación inter-ensayo por placa fue  $<1.0 \Delta\text{Ct}$  para cada gen testado.

#### **4.7 Recogida y análisis de datos**

Los datos clínicos del presente trabajo se recogieron en programas informáticos durante los controles de salud del niño sano. Se utilizó el programa informático SPSS versión 12.0 para el análisis estadístico de los datos. Se transformaron matemáticamente las variables cuantitativas que no siguieron una distribución normal. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias

debidas al género se examinaron mediante la prueba t de Student. El nivel de significación estadística se fijó en  $p < 0.05$ .

Se analizaron las asociaciones entre los diferentes marcadores mediante análisis de correlación y posteriormente se ajustaron las asociaciones significativas por variables de confusión mediante análisis de regresión múltiple. Para el estudio de las hormonas tiroideas, se dividió, asimismo, la población de estudio en tertiles de T4 libre en suero y se estudiaron las diferencias para las variables de interés entre los tertiles mediante análisis de la varianza (ANOVA) y modelo de regresión lineal múltiple (que permite ajustar por variables modificadoras de efecto y variables confusión). Las diferencias en las concentraciones de adiponectina en el medio de cultivo se examinaron mediante la prueba t de Student.

# **5 RESULTADOS**



**5.1 Artículo I:**

Relative hypoadiponectinemia, insulin resistance and increased visceral fat in euthyroid prepubertal girls with low-normal serum free thyroxine.



Prats-Puig, A., Sitjar, C., Ribot, R., Calvo, M., Clausell-Pomés, N., Soler-Roca, M. et al. "Relative hypoadiponectinemia, insulin resistance, and increased visceral fat in euthyroid prepubertal girls with low-normal serum free thyroxine". *Obesity*. Vol. 20 (july 2012) : p. 1455-1461

Copyright © 2012, Rights Managed by Nature Publishing Group

<http://www.nature.com/oby/journal/v20/n7/full/oby2011206a.html>

<http://dx.doi.org/10.1038/oby.2011.206>

## **Abstract**

A lower activity of the thyroid axis within the clinical reference range is related to a dysmetabolic phenotype in adult populations. We posited that such an association is already present as early as in prepubertal childhood. Serum thyroid stimulating hormone (TSH) and free T4, body fat (bioelectric impedance), insulin resistance (homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA<sub>IR</sub>)), total and high molecular weight (HMW)-adiponectin and serum lipids were assessed in 234 euthyroid prepubertal children (113 boys and 121 girls) attending primary care clinics. Visceral fat (abdominal ultrasound) was measured in a subset of these subjects (n = 147; 74 boys and 73 girls). Explants of visceral adipose tissue from an additional six prepubertal children (three boys and three girls) were used to study the regulation of total and HMW-adiponectin by thyroid hormone. Serum free T4 was in girls independently associated with HMW-adiponectin, HOMA<sub>IR</sub> and visceral fat, so that circulating HMW-adiponectin decreased by 30% ( $\beta = 0.305$  P < 0.005,  $R^2 = 0.13$ ) and HOMA<sub>IR</sub> and visceral fat increased, respectively, by 90% ( $\beta = -0.255$  P < 0.01,  $R^2 = 0.05$ ) and 30% ( $\beta = -0.369$ , P < 0.005,  $R^2 = 0.12$ ) from the highest to the lowest tertile of serum free T4. Nonsignificant differences in these parameters were found in boys. Treatment of visceral fat explants with thyroid hormone increased total and HMW-adiponectin by 70% and 53%, respectively, above control values (P < 0.01). In conclusion, a dysmetabolic phenotype, consisting of relative hypoadiponectinemia, insulin resistance and increased visceral fat, is associated with low-normal serum free thyroxine in euthyroid prepubertal girls. These associations may be partly explained by a positive regulation of HMW-adiponectin secretion by thyroid hormone.



**5.2 Artículo II:**

Carboxylation of osteocalcin affects its association with metabolic parameters in healthy children.



# Carboxylation of Osteocalcin Affects Its Association With Metabolic Parameters in Healthy Children

ANNA PRATS-PUIG, MS<sup>1</sup>  
 MARTA MAS-PARAREDA, MD<sup>2</sup>  
 ELENA RIERA-PÉREZ, MD<sup>3</sup>  
 DOLORS GONZÁLEZ-FORCADELL, MD<sup>2</sup>  
 CONCEPCIÓ MIER, MD<sup>2</sup>  
 MONTSERRAT MALLOL-GUISSET, RN<sup>2</sup>

MARTA DÍAZ, PHD<sup>4</sup>  
 JUDIT BASSOLS, PHD<sup>1</sup>  
 FRANCIS DE ZEGHER, MD, PHD<sup>5</sup>  
 LOURDES IBÁÑEZ, MD, PHD<sup>4</sup>  
 ABEL LÓPEZ-BERMEJO, MD<sup>1</sup>

**OBJECTIVE**— Osteocalcin (OC), a bone-derived protein, was recently shown to regulate metabolic pathways in mice. Undercarboxylated OC (ucOC), but not carboxylated OC (cOC), increases adiponectin and insulin secretion. It is unclear if carboxylation of OC affects its association with metabolic parameters in humans.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS**— The associations between ucOC, cOC, total and high-molecular-weight (HMW) adiponectin, and insulin secretion (homeostasis model assessment [HOMA]- $\beta$ ) were investigated in a population-based sample of healthy prepubertal children ( $n = 103$ ; 49 boys and 54 girls).

**RESULTS**— Weight-dependent associations were observed between the different forms of OC and metabolic parameters. Higher cOC was related to lower HMW adiponectin (with a stronger association in leaner children;  $P < 0.001$ ). Higher ucOC-to-cOC ratio was associated with higher HOMA- $\beta$  ( $P < 0.01$ ) in leaner children and associated with higher HMW adiponectin ( $P < 0.001$ ) in heavier children.

**CONCLUSIONS**— In a weight-dependent manner, cOC and the proportion of ucOC are differentially related to HMW adiponectin and insulin secretion in healthy children.

*Diabetes Care* 33:661–663, 2010

There is feedback between glucose and bone metabolism (1). Adiponectin, a protein secreted by the adipose tissue with insulin-sensitizing and anti-atherosclerotic properties (2), has emerged as an element in the regulation of bone mass (3). Recent studies have closed this feedback by revealing a direct regulation of metabolic pathways by the skeleton through osteocalcin (OC) production (4).

Osteocalcin, an osteoblast product, is the most abundant noncollagenous protein of bone matrix and a long-known pa-

rameter of bone formation (5). The protein is subjected to posttranslational carboxylation by a vitamin K-dependent carboxylase to yield carboxylated (cOC) and undercarboxylated (ucOC) molecules. cOC has higher affinity for hydroxyapatite and is thought to be the active form in the bone (5).

Recent studies have disclosed that ucOC, but not cOC, is capable of enhancing adiponectin and insulin secretion in mice (4,6); clinical studies have shown independent associations between circulating total OC and metabolic traits in

adult populations (7–10). However, it is currently unclear which of the carboxylated forms of OC is associated with metabolism in humans.

We investigated the clinical associations between both serum ucOC and cOC, total and high-molecular-weight (HMW) adiponectin (because it is unknown if this fraction of the protein is related to serum OC), and insulin secretion (homeostasis model assessment [HOMA]- $\beta$ ) in a population-based sample of healthy children. Our primary hypothesis was that serum ucOC is the preferred molecular form associated with adiponectin and insulin secretion. As a secondary hypothesis, any given association between cOC and metabolic parameters is a reflection of the known regulation of bone mass by metabolism, given that 1) cOC is the active form in the bone and 2) cOC does not have metabolic effects in vitro or in vivo.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

Subjects were 103 school-age Caucasian children (49 boys and 54 girls; aged  $6.6 \pm 0.1$  years; supplementary Table 1 in the online appendix, available at <http://care.diabetesjournals.org/cgi/content/full/dc09-1837/DC1>) consecutively recruited among children seen at the pediatric primary care clinics for well-child checkup visits in Alt Empordà, a region in northern Spain. Inclusion criteria included age between 5 and 9 years and absence of puberty. Exclusion criteria were evidence of acute or chronic illness. The protocol was approved by the regional Institutional Review Board. Informed written consent was obtained from the parents.

Weight and height were measured with a calibrated scale and a Harpenden stadiometer, respectively. Waist circumference was measured at the umbilical level. Blood pressure was measured with an electronic sphygmomanometer. Body composition was assessed by bioelectric impedance (Hydra Bioimpedance Analyzer 4200; Xitron Technologies, San Diego, CA).

Fasting serum glucose, lipids, and immunoreactive insulin were assayed as de-

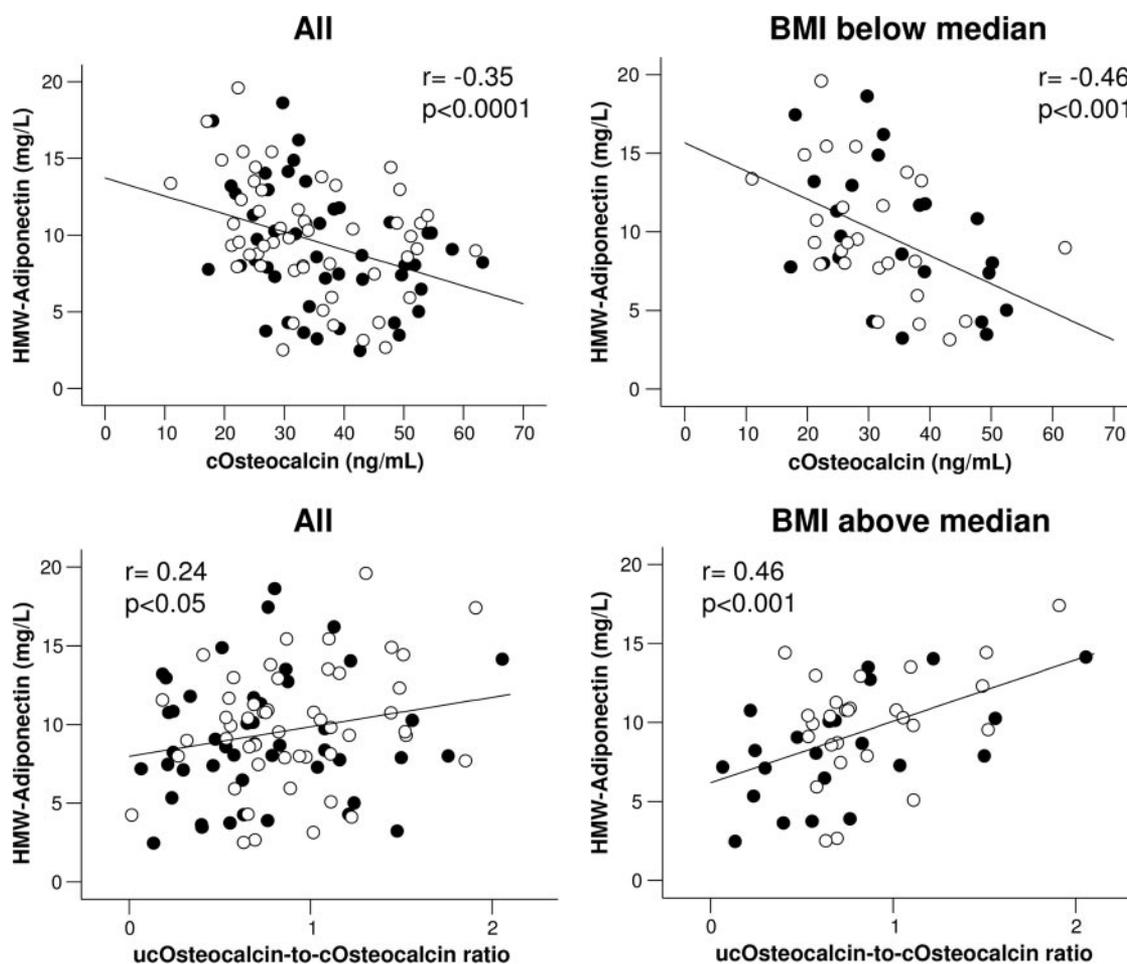
From <sup>1</sup>Pediatrics, Dr. Josep Trueta Hospital and Girona Institute for Biomedical Research, Girona, Spain; <sup>2</sup>Primary Care Pediatrics, Catalan Institute of Health, Figueres, Spain; <sup>3</sup>Pediatrics, Salut Empordà Foundation, Figueres, Spain; <sup>4</sup>Pediatric Endocrinology, Sant Joan de Déu Children's Hospital, Esplugues, Barcelona, and CIBERDEM (Center for Network Biomedical Research in Diabetes and Related Metabolic Diseases), ISCIII, Madrid, Spain; and the <sup>5</sup>Department of Woman and Child, University of Leuven, Leuven, Belgium.

Corresponding author: Abel López-Bermejo, [alopezbermejo.girona.ics@gencat.cat](mailto:alopezbermejo.girona.ics@gencat.cat).

Received 4 October 2009 and accepted 9 December 2009. Published ahead of print at <http://care.diabetesjournals.org> on 15 December 2009. DOI: 10.2337/dc09-1837.

© 2010 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.



**Figure 1**—Correlation graphs of both carboxylated osteocalcin (cOsteocalcin) and undercarboxylated-to-carboxylated osteocalcin (ucOsteocalcin-to-cOsteocalcin) ratio with HMW adiponectin in healthy children ( $n = 103$ ) and in subgroups according to a BMI cutoff (below or above the median). ● and ○ depict boys and girls, respectively.  $r$  and  $P$  values are from Pearson analyses.

scribed (11). Insulin sensitivity and secretion were estimated by the homeostasis model assessment (HOMA-insulin resistance [IR] and HOMA- $\beta$  [12]). Total and HMW adiponectin (the active fraction of the protein) were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (Linco, St. Charles, MO) (10). Total OC was measured by an enzyme immunological test (Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Denmark) with a sensitivity of 0.5 ng/ml, and ucOC was measured by a solid-phase enzyme immunoassay (EIA) kit (Glu-OC MK-118; Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan) with a sensitivity of 0.25 ng/ml. Coefficients of variation at our laboratory were  $<6\%$ . Serum cOC was calculated as the difference between total and ucOC.

Statistical analyses using SPSS version 12.0 (SPSS, Chicago, IL) consisted of simple correlation followed by stepwise multiple regression. ucOC-to-cOC ratio, rather than ucOC, was used to correct for

the parallel inverse change in cOC. Significance level was set at  $P < 0.05$ .

**RESULTS**— Weight-dependent associations were observed between the different forms of OC and metabolic parameters. Higher cOC was related to lower HMW adiponectin (with a stronger association in leaner children;  $P < 0.001$ ; Fig. 1). Higher ucOC-to-cOC ratio in leaner children was associated with higher HOMA- $\beta$  ( $P < 0.01$ ) and in heavier children associated with higher HMW adiponectin ( $P < 0.001$ ; Fig. 1). These associations were either decreased or absent for total adiponectin.

In multiple regression analyses, both HMW adiponectin ( $\beta = -1.04$  to  $-1.32$ ;  $R^2 = 0.11$ – $0.20$ ) and BMI ( $\beta = 3.06$ ,  $R^2 = 0.07$ ) were independently related to cOC. In similar analyses, ucOC-to-cOC ratio ( $\beta = 1.58$ – $3.76$ ;  $R^2 = 0.04$ – $0.20$ ) was independently related to HMW adi-

ponectin. Nonpredictive variables were sex, fat mass, and HOMA-IR.

Finally, ucOC-to-cOC ratio was independently related to HOMA- $\beta$  ( $\beta = 0.17$ ,  $R^2 = 0.08$ ). Nonpredictive variables were sex, BMI, and fat mass. This association, however, was apparent in leaner but not in heavier children.

**CONCLUSIONS**— Our study defines the clinical associations between the different carboxylated forms of OC and metabolic parameters in healthy children.

Recent clinical reports have demonstrated significant associations between circulating total OC and adiponectin in adults (7–10,13). Data regarding the relation to insulin secretion are scarcer (8). Despite the fact that most of these studies did not discern between ucOC and cOC, the associations were assumed as being consistent with the purported role of ucOC regulating adiponectin and insulin secretion (4). Our results support these

findings and those from experimental research (4,6) pointing, for the first time, to our knowledge, to an increase in the relative concentration of ucOC as being associated with both increased HMW adiponectin and insulin secretion in humans.

Our findings also indicate that cOC (the active form in the bone) is related to metabolic parameters in humans. The independent associations between cOC and both HMW adiponectin and BMI fit well with the known regulation of bone mass by metabolic parameters (14), particularly with the known inverse association between adiponectin and bone mass (1). These observations, together with the fact that adiponectin receptors are expressed in osteoblasts (15), support a possible role of HMW adiponectin in the regulation of OC expression and/or carboxylation, thereby opening the perspective for an adiponectin-osteocalcin loop in humans.

Our study finally suggests different priorities in the reciprocal regulation of glucose and bone metabolism depending on the weight status. The abundance of HMW adiponectin in leaner subjects may contribute to the relative osteopenia commonly observed in these subjects. An increase in the relative proportion in ucOC may contribute to improved insulin secretion in leaner subjects and compensate for the decrease in HMW adiponectin in heavier subjects.

In conclusion, in a weight-dependent manner, carboxylation of OC affects its association with metabolic parameters in healthy children.

**Acknowledgments**—This work was supported by grant 07/0404 (to A.L.-B.) from the National Institute of Health Carlos III (Fund for Health Research [FIS], Spain). M.D. and L.I. are Clinical Investigators for CIBERDEM (Center for Network Biomedical Research in Diabetes and Related Metabolic Diseases) from

the National Institute of Health Carlos III, Spain. J.B. is an Investigator for the Fund Sara Borrell from the National Institute of Health Carlos III, Spain. F.d.Z. is a Clinical Investigator for the Fund for Scientific Research (Flanders, Belgium). A.L.-B. is an Investigator for the Fund for Scientific Research I3 (Ministry of Science and Innovation, Spain).

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

The authors are grateful to all the children and parents who took part in the study.

## References

- Richards JB, Valdes AM, Burling K, Perks UC, Spector TD. Serum adiponectin and bone mineral density in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1517–1523
- Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:561–566
- Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, Liao EY. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 2006;21:1648–1656
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007;130:456–469
- Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000;37:432–446
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5266–5270
- Fernández-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, Gorostiaga E, Gómez-Ambrosi J, Moreno-Navarrete JM, Frühbeck G, Martínez C, Idoate F, Salvador J, Forga L, Ricart W, Ibañez J. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:237–245
- Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:827–832
- Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S, Sugimoto T. Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:45–49
- Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Mellström D. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 2009;24:785–791
- Ibañez L, Sebastiani G, Lopez-Bermejo A, Diaz M, Gómez-Roig MD, de Zegher F. Gender specificity of body adiposity and circulating adiponectin, visfatin, insulin, and insulin growth factor-I at term birth: relation to prenatal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2774–2778
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–419
- Shea MK, Gundberg CM, Meigs JB, Dallal GE, Saltzman E, Yoshida M, Jacques PF, Booth SL. Gamma-carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1230–1235
- Blum M, Harris SS, Must A, Phillips SM, Rand WM, Dawson-Hughes B. Weight and body mass index at menarche are associated with premenopausal bone mass. *Osteoporos Int* 2001;12:588–594
- Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 2004;35:842–849



**5.3 Artículo III:**

Soluble fatty acid synthase relates to bone turnover markers in prepubertal children



A. Prats-Puig, T. Puig, C. Sitjar, M. Mas-Parareda, P. Grau-Cabrera, P. Soriano-Rodríguez, M. Montesinos-Costa, M. Diaz, F. de Zegher and L. Ibáñez, et al. "Soluble fatty acid synthase relates to bone biomarkers in prepubertal children". *Osteoporosis International*. Vol 23, num. 7 (2012) : p. 2053-2058

Copyright © 2011, International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation

<http://www.springerlink.com/content/21ljq71930863583/>

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-011-1759-y>

## Abstract

### Summary

Circulating soluble fatty acid synthase (FASN, a key enzyme in de novo biosynthesis of fatty acids, expressed in both adipocytes and osteoblasts) is clinically related to a less favorable bone profile in healthy prepubertal children. Soluble FASN may participate in the reciprocal regulation between fat and bone metabolism.

### Introduction

Fatty acid synthase (FASN), a key enzyme in de novo biosynthesis of fatty acids, is expressed in adipocytes and osteoblasts. We hypothesized that FASN may participate in the crosstalk between fat and bone. To this aim, we studied the relation between circulating soluble FASN (an extracellular FASN that reflects previously intracellular enzymatic activity) and adipose tissue and bone biomarkers in prepubertal children.

### Methods

Circulating soluble FASN, total and high molecular weight (HMW) adiponectin, bone biomarkers [osteocalcin (OC), uncarboxylated osteocalcin (ucOC), C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (CTX), bone-specific alkaline phosphatase (BSAP)], and a profile of energy metabolism [body fat, insulin resistance and secretion (HOMA), serum lipids] were assessed in 84 asymptomatic prepubertal children (44 girls, 40 boys, age  $6.8 \pm 0.1$  year). Serum 25-OH Vitamin D (Vit D) was additionally measured.

### Results

Circulating soluble FASN increased with increasing HMW adiponectin ( $r = 0.29$ ,  $p = 0.01$ ) and decreasing serum Vit D ( $r = -0.21$ ,  $p < 0.05$ ), and was related to a less favorable bone profile, showing negative associations with bone-derived metabolic parameters [total OC ( $r = -0.33$ ,  $p = 0.002$ ) and ucOC ( $r = -0.37$ ,  $p < 0.0001$ )] and a positive association with the CTX-to-BSAP ratio ( $r = 0.31$ ,  $p < 0.01$ ). These correlations were not explained by age, gender, body fat, insulin resistance or secretion or serum lipids; however, they were predominant in those subjects with Vit D levels below the population median.

## **Conclusions**

Circulating soluble FASN relates to both adipose tissue and bone biomarkers in prepubertal children, with associations that are dependent on Vit D concentrations. These findings suggest that FASN may participate in the crosstalk between fat and bone metabolism.

## **Keywords**

Adiponectin – Bone – Bone-specific alkaline phosphatase (BAP) – C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (CTX) – Child – Fatty acid synthase – Osteocalcin – Vitamin D

# 6 DISCUSIÓN



Los resultados derivados de este estudio indican que los niveles de T4 libre en suero se relacionan con una disminución de la resistencia a la insulina y de la grasa visceral. Asimismo, la T3, hormona derivada de la T4, favorece la secreción tanto de la adiponectina total como de la de APM en tejido adiposo *ex vivo*. Por otra parte, la osteocalcina descarboxilada se asocia con un incremento de secreción de insulina, mientras que el aumento la osteocalcina carboxilada se relaciona negativamente con la adiponectina de APM. Finalmente, se han descrito relaciones entre FASN y marcadores del metabolismo óseo, que permiten vincular la FASN y la adiponectina de APM con un perfil metabólico óseo menos favorable.

## **6.1 Feedback entre tejido adiposo y eje tiroideo**

### **6.1.1 Adiponectina y hormonas tiroideas**

Estudios previos han relacionado la función tiroidea, en el rango eutiroideo, con un fenotipo metabólico desfavorable en poblaciones adultas(152-154). Concretamente se han relacionado concentraciones bajas de T4 libre en sangre con componentes del síndrome metabólico(152-154). Asimismo, un estudio prospectivo concluyó que la variación de la función tiroidea en el rango clínico de referencia modificaba el riesgo de enfermedad coronaria en edad adulta(155). Este hecho, se puede explicar por el efecto positivo que las hormonas tiroideas tienen en la regulación transcripcional de GLUT4, implicado en el metabolismo de la glucosa(156). Además, estas hormonas también pueden causar vasodilatación periférica a través de efectos directos sobre las células del músculo liso, mejorando la contractibilidad cardíaca e inhibiendo la formación de la neo-íntima y, por lo tanto, atenuando los posibles problemas cardiovasculares(157).

Es sabido que los factores de riesgo en la edad pediátrica predicen el riesgo de enfermedad cardiovascular en la edad adulta(158), pero se desconoce si la función tiroidea, en el rango fisiológico, también se asocia con parámetros metabólicos en niños sanos. En uno de los pocos estudios publicados al respecto, concentraciones bajas de T4 libre se asociaban con elevadas concentraciones circulantes de marcadores cardiovasculares en niños obesos(82).

En el presente estudio, aportamos evidencias de que las concentraciones más bajas de T4 libre en suero se asocian con una disminución de adiponectina de APM (Figura 21) y un incremento de grasa visceral en niñas prepuberales eutiroideas. Los resultados de los parámetros metabólicos son, sin embargo, indicativos de un efecto umbral, con un perfil metabólico más desfavorable restringido a aquellos sujetos que se encuentran en el tercio más bajo de T4 libre. Cabe destacar que los niños a los que no se pudo realizar la ecografía (por motivos de accesibilidad del paciente al centro sanitario) no diferían significativamente en las principales variables de estudio respecto al grupo de niños incluidos en el análisis.

Aunque parece claro que hay una asociación positiva entre T4 y la adiponectina de APM, tanto en adultos como en niños, el mecanismo que rige la relación entre estas hormonas es desconocido. No está claro si las hormonas tiroideas regulan la expresión y/o secreción de la adiponectina mediante su acción sobre el tejido adiposo, o la relación con la T4 es debida a un efecto indirecto del metabolismo.

Se sabe que el hipertiroidismo cursa con elevadas concentraciones de adiponectina en suero(104), mientras que su concentración no se ve modificada en sujetos hipotiroideos(101). Del mismo modo, la adiponectina en suero incrementa con el hipertiroidismo experimental, pero no se modifica induciendo hipotiroidismo en

ratones(52). Varios estudios han demostrado que la expresión génica de la adiponectina no está regulada por las hormonas tiroideas(102; 159); no obstante, sus efectos en la secreción de la proteína aún son desconocidos. En este sentido, nuestros resultados demuestran que las hormonas tiroideas pueden regular positivamente la secreción tanto de adiponectina total como de APM sin afectar a su expresión génica en tejido adiposo visceral de niños sanos. En nuestro estudio, no se observaron diferencias según el género en los explantes de tejido adiposo tratados con T<sub>3</sub>, pero sería necesario un mayor número de muestras para determinar si la regulación de la secreción de adiponectina por las hormonas tiroideas es más relevante en niñas que en niños.

Recientemente, se ha demostrado que la ruta celular cJun N-terminal quinasa 1 (JNK1), ruta implicada en la obesidad inducida por la dieta, puede actuar sobre el eje hipotalámico-pituitario-tiroideo(160). Por lo tanto, no se puede excluir que un incremento de la actividad de JNK1 junto con un incremento de la obesidad abdominal pueda resultar en una regulación negativa del eje tiroideo.

Nuestros resultados muestran que los niveles séricos de T4 libre, dentro del rango fisiológico de normalidad, se asocian negativamente con la resistencia a la insulina (Figura 21). Esta relación se había demostrado anteriormente en adultos, pero no en poblaciones pediátricas(152; 153). Un estudio reciente ha demostrado que la levotiroxina a dosis TSH-supresivas puede mejorar la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en sujetos con una mutación del gen del receptor de la insulina. Un posible mecanismo implicado en esta observación incluye la inducción del tejido adiposo marrón(161). En este sentido, otros estudios indican que las hormonas tiroideas pueden modificar la actividad de AMPK y el metabolismo lipídico en el

hipotálamo, influyendo así sobre las vías reguladoras más importantes de la homeostasis energética del organismo(162).

La relación entre una menor actividad del eje tiroideo y un fenotipo metabólicamente desfavorable parece diferente entre adultos y niños. En primer lugar, mientras que esta asociación en adultos se ha observado en ambos sexos(153; 154), en nuestro estudio, sólo ha sido fácilmente detectable en niñas y no en niños. La aparente especificidad de género de las asociaciones entre las concentraciones bajas de T4 libre en suero y la hipoadiponectinemia, la resistencia a la insulina y la adiposidad visceral en niños prepuberales puede deberse a un dimorfismo sexual en cuanto al tiempo de maduración y en la sensibilidad a la insulina. A la edad de 7 años, las niñas están más cerca del inicio puberal que los niños, y además las niñas pueden ya estar en una fase de maduración más avanzada que los niños, tal como indican sus niveles de IGF-I y por su mayor adiposidad corporal y una mayor resistencia a la insulina(163; 164). Un seguimiento longitudinal de estos niños podría revelar si la asociación mencionada puede aparecer en un estadio similar de maduración también en niños.

En segundo lugar, en adultos, la TSH – y en menor medida la T4 libre – se asocia con marcadores de fenotipo dismetabólico(154), mientras que, en niñas prepuberales, es la T4 libre – más que la TSH – la que se asocia con la adiposidad visceral, la insulinemia y adiponectinemia en ayunas. Resta pendiente caracterizar si, en niños, las asociaciones metabólicas con la TSH se desarrollan con mayor frecuencia en individuos con sobrepeso o mayores, tal como ha sido descrito en adultos(165; 166). En conjunto, estas observaciones sugieren que la homeostasis de las hormonas tiroideas difiere entre niños sanos y adultos.

Nuestros resultados son también pertinentes para la relación que existe entre el hipotiroidismo subclínico y el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular(154; 162-166). Estos trabajos sugieren que la asociación entre el hipotiroidismo subclínico y la enfermedad cardiovascular depende de la edad y del sexo, con asociaciones preferentes en jóvenes y en mujeres.

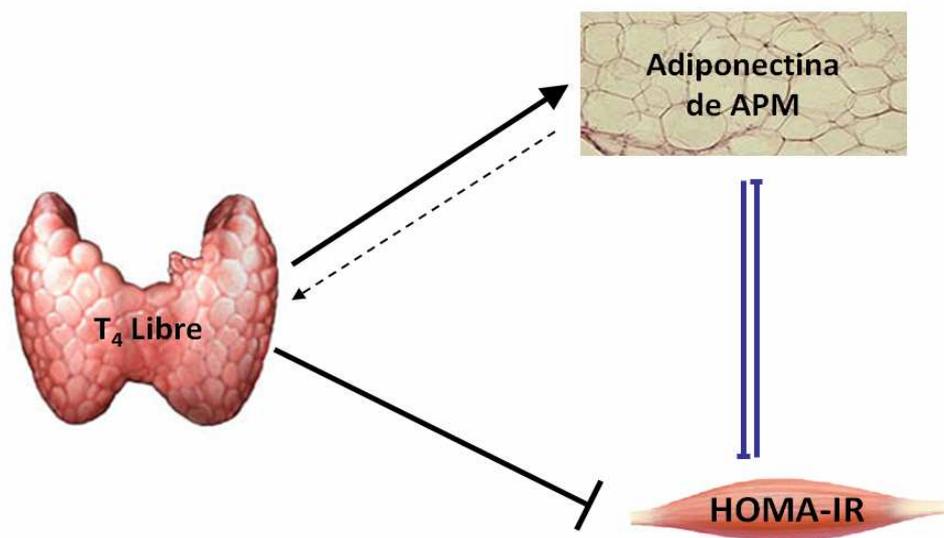


Figura 21: Modelo propuesto de asociación entre la T<sub>4</sub> y el metabolismo energético. Línea continua: vía predominante; línea discontinua: vía no predominante; flecha: estimulación; flecha troncada: inhibición; línea azul: resultados de la literatura.

## 6.2 Feedback entre el tejido adiposo y el hueso

### 6.2.1 Adiponectina y osteocalcina

Estudios previos han demostrado la existencia de un *feedback* entre la glucosa y el metabolismo óseo(167). Concretamente, se ha descrito que la adiponectina puede regular la masa ósea(127); mientras que la OC, producida por el hueso, puede regular diversas rutas metabólicas(122).

Estudios clínicos recientes en adultos, han demostrado asociaciones significativas entre las concentraciones circulantes de adiponectina y las concentraciones circulantes de OC total(124-126; 168; 169). No obstante, la mayoría

de estos estudios no disciernen entre las diferentes formas de la OC –dcOC y cOC-, mientras que algunos atribuyen las asociaciones metabólicas a la forma descarboxilada, y no a la carboxilada, debido a su capacidad de aumentar la secreción de insulina en ratones(122). Nuestros resultados apoyan tanto a los estudios realizados en humanos como aquellos provenientes de la investigación experimental(122; 125; 126; 128), al describir por vez primera, que un incremento en la concentración relativa de dcOC se asocia tanto a un incremento de la adiponectina de APM como a la secreción de insulina. Hipotetizamos, así, que en humanos, también sería la forma descarboxilada de la OC la forma capaz de estimular la secreción de insulina ya desde la infancia (Figura 22).

Nuestros resultados indican que la cOC se relaciona con parámetros metabólicos en humanos. Las asociaciones independientes entre la cOC tanto con la adiponectina de APM como con el IMC concuerdan bien con la regulación conocida entre la masa ósea y parámetros metabólicos(170), particularmente, con la asociación inversa conocida entre la adiponectina y la masa ósea(167), aunque, hasta la fecha, los estudios publicados no han diferenciado entre las diferentes formas de una u otra molécula. Estas observaciones, junto con el hecho que los osteoblastos expresan receptores de adiponectina(171), apoyan el posible papel de la adiponectina de APM en la regulación de la expresión y/o la carboxilación de la OC, además de generar una nueva perspectiva para una regulación mutua entre la adiponectina y la OC en humanos. Recientemente, se ha sugerido que el receptor acoplado a la proteína G huérfana (GPRC6A) es un mediador de algunas acciones de la OC *in vivo*, hecho que indica una ruta molecular que pueda unir el hueso y el metabolismo energético(172).

El presente estudio también sugiere una regulación recíproca del metabolismo óseo y el energético dependiendo del peso corporal. El incremento de adiponectina de APM en sujetos delgados podría contribuir a la osteopenia comúnmente observada en estos individuos. Mientras que un incremento en la concentración relativa de dcOC podría contribuir a mejorar la secreción de insulina en sujetos delgados y contribuir a la disminución de adiponectina de APM en sujetos obesos (Figura 22).

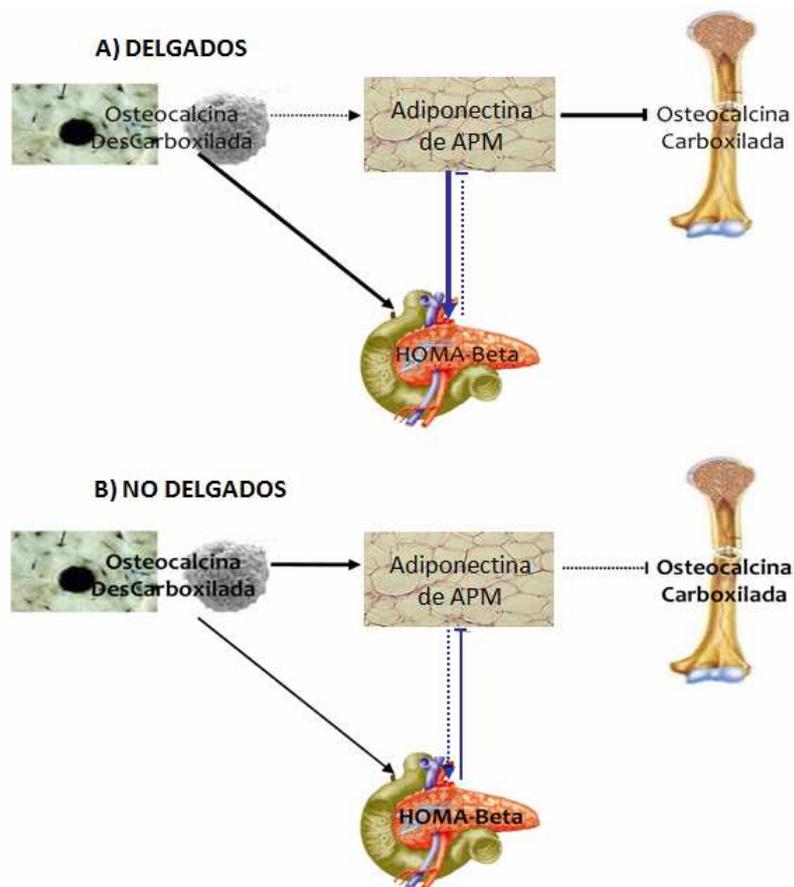


Figura 22: Modelo propuesto de asociación entre la OC y el metabolismo energético. a) en individuos delgados y b) en individuos no delgados. Línea continua: vía predominante; línea discontinua: vía no predominante; flecha: estimulación; flecha troncada: inhibición; línea azul: resultados de la literatura.

### 6.2.2 Adiponectina, FASN y marcadores óseos

Las rutas de señalización moduladas por la adiponectina en los órganos diana son aún poco conocidas. Se ha descrito que la adiponectina es capaz de regular parcialmente la homeostasis energética en el músculo esquelético y el hígado a través de la activación de AMPK(13).

Nuestros resultados muestran que elevadas concentraciones de FASN circulantes se asocian a mayores concentraciones de adiponectina de APM en niños sanos. Hipotetizamos que la adiponectina de APM podría regular la actividad del propio tejido adiposo y aumentar las concentraciones de FASN extracelular a través de la estimulación de la actividad AMPK, como sucede en las líneas celulares de cáncer (Figura 23)(72).

La homeostasis del hueso también es dependiente de la actividad de AMPK. Concretamente, la activación de AMPK está relacionada funcionalmente con una disminución de la diferenciación de los osteoblastos, disminuyendo la expresión de OC y modulando, asimismo, la formación ósea(173). En nuestro estudio, la FASN soluble se asocia también con biomarcadores óseos. Esta asociación podría reflejar el control de la homeostasis ósea por el metabolismo energético, a través de la producción de adiponectina(129) y la activación de la ruta AMPK(13).

Además de la adiponectina, se sabe que tanto los ácidos grasos de la dieta como la producción endógena de ácidos grasos (p.ej: debido a la actividad de FASN) pueden regular el metabolismo óseo(174; 175). Un estudio hipotetizó que los adipocitos de la médula exhiben un efecto lipotóxico en la función y supervivencia osteoblástica a través de la biosíntesis y liberación de ácidos grasos al microambiente de la médula ósea(174). Además se demostró que los ácidos grasos también

modulaban la supervivencia de los osteoclastos(176). En nuestro estudio, la FASN circulante presenta asociaciones negativas con parámetros metabólicos derivados del hueso (OC y dcOC) y asociaciones positivas con la ratio CTX-fosfatasa alcalina, marcador de remodelación ósea. Es por tanto razonable, proponer que la actividad de FASN podría influenciar el remodelado óseo a través de la biosíntesis de ácidos grasos (Figura 23). En nuestro estudio no se pudo realizar la cuantificación de los marcadores de remodelación ósea a todos los sujetos del estudio por razones ajenas a la selección de lo sujetos. Por este motivo, la ampliación del estudio a una muestra mayor de sujetos sería de utilidad para determinar la importancia de las relaciones aquí mencionadas.

Estudios recientes han demostrado regulaciones bidireccionales entre el tejido adiposo y el esqueleto a través de la producción de OC(128; 177). Se sabe que la dcOC puede reducir la masa grasa e incrementar la secreción de adiponectina. La asociación entre la dcOC y FASN soluble en niños sanos sugiere que las dos moléculas puedan estar relacionadas fisiológicamente. No podemos excluir la posibilidad de que la dcOC pueda limitar la biosíntesis de ácidos grasos a través de la regulación de la actividad de FASN, lo cual apoyaría la estrecha relación entre el hueso y el tejido adiposo (Figura 23).

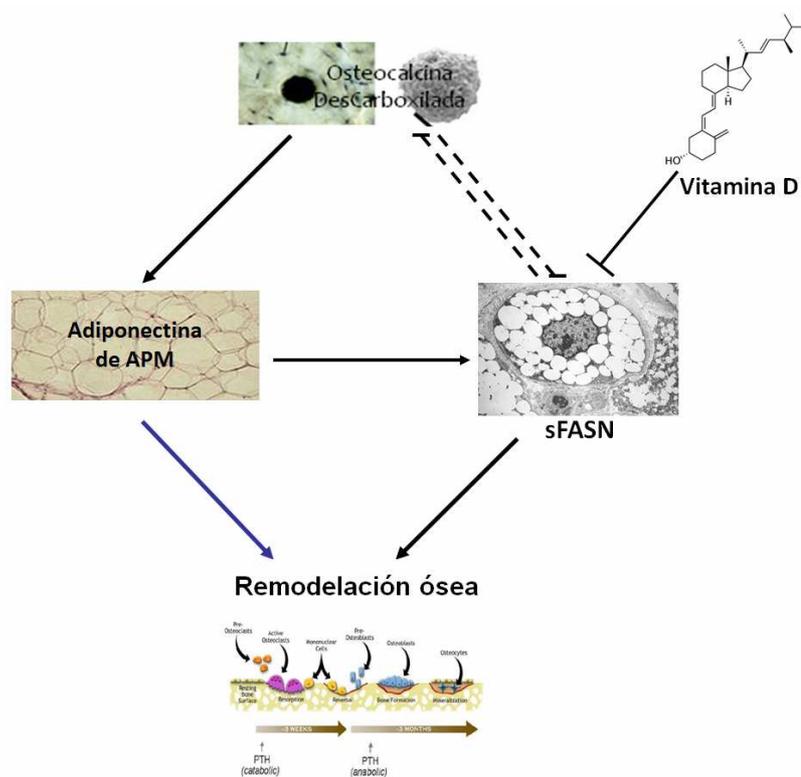


Figura 23: Modelo propuesto de asociación entre la adiponectina de APM y el hueso. Línea continua: vía predominante; flecha: estimulación; flecha troncada: inhibición; línea azul: resultados de la literatura.

Como parte de sus efectos anti-proliferativos, la vitamina D regula negativamente la expresión de FASN en células cancerosas(178). Nuestros estudios muestran una relación negativa entre FASN circulante y los niveles de vitamina D, y demuestran que las asociaciones de FASN con la adiponectina de APM y con los marcadores óseos son dependientes de dicha molécula, pues son mejores en los sujetos con niveles de vitamina D inferiores a la media. Estos resultados sugieren que la vitamina D también podría modular la actividad de FASN en sujetos sanos. Además, la insuficiencia de vitamina D, podría agravar el fenotipo desfavorable como resultado de una elevada actividad de FASN tanto en el tejido adiposo como en el óseo. Debido a que en pediatría no existe un consenso para determinar los niveles de deficiencia de

vitamina D, en nuestro estudio se utilizó como punto de corte la mediana de la concentración sérica de vitamina D.

Tal como se ha explicado anteriormente, una posible interpretación de nuestros resultados es que las moléculas derivadas del tejido adiposo: FASN y adiponectina de APM, podrían participar en la regulación recíproca entre el metabolismo óseo y el energético. Por una parte, la actividad de FASN tanto en células adiposas como en la médula ósea o en los osteoblastos, podría regular la homeostasis ósea, incluyendo la expresión o carboxilación de la OC y el remodelado óseo. La adiponectina de APM, podría tener un papel importante en este proceso, regulando la secreción de FASN en el tejido adiposo o directamente inhibiendo la diferenciación y posterior expresión de marcadores óseos en los osteoblastos. Por otra parte, la actividad de FASN y adiponectina en el tejido adiposo, podrían estar regulados por la dcOC. Finalmente, estos procesos, podrían estar modulados por la vitamina D.

### **6.3 Discusión conjunta de los resultados**

En resumen, un fenotipo dismetabólico, consistente en una relativa hipoadiponectinemia, resistencia a la insulina y un incremento de la grasa visceral, se asocian con una concentración normal-baja de T4 libre (dentro del rango fisiológico de normalidad), en niñas prepuberales. Estas asociaciones podrían ser debidas, en parte, por la regulación positiva de las hormonas tiroideas sobre la secreción de la adiponectina de APM.

Asimismo, un incremento de la dcOC se asocia a la adiponectina de APM y a la secreción de insulina; mientras que la cOC se relaciona tanto con la adiponectina de APM como con el IMC. Nuestros resultados sugieren, pues, que las concentraciones de

adiponectina de APM podrían afectar tanto a la expresión y/o carboxilación de la OC como a la secreción de insulina de manera dependiente del peso corporal. Estos resultados generan una nueva perspectiva para una regulación mutua entre la adiponectina y la OC en humanos.

Finalmente, observamos una relación entre la adiponectina de APM y FASN soluble, y aportamos evidencias de que la FASN soluble podría participar en la regulación recíproca entre el metabolismo energético y el óseo, asociándose con un perfil metabólico óseo menos favorable (Figura 24). Además, la insuficiencia de vitamina D podría agravar este fenotipo desfavorable como resultado de una elevada actividad de FASN.





# **7 CONCLUSIONES**



Las concentraciones más bajas de T4 libre en suero se asocian con una disminución de adiponectina de APM, y un incremento de HOMA-IR y grasa visceral en niñas prepuberales eutiroideas.

1. Las hormonas tiroideas regulan positivamente la secreción de adiponectina total y de adiponectina de APM, sin afectar a su expresión génica, en tejido adiposo visceral de escolares sanos.
2. Un incremento en la concentración relativa de cOC se asocia a una disminución de la adiponectina de APM, siendo esta relación más fuerte en niños con menor peso corporal.
3. El porcentaje de osteocalcina descarboxilada se asocia a una mayor secreción de insulina en niños con menor peso y a una mayor concentración de adiponectina de APM en niños con mayor peso.
4. Las concentraciones de FASN extracelular se asocian con elevadas concentraciones de adiponectina de APM y bajas concentraciones de vitamina D.
5. Las concentraciones de FASN extracelular se relacionan con un perfil óseo menos favorable, pues muestran asociaciones negativas con proteínas derivadas del hueso (OC total y dcOC) y asociaciones positivas con marcadores de remodelación ósea (ratio CTX-fosfatasa alcalina). Estas asociaciones clínicas son destacables en niños con niveles de vitamina D inferiores a la media.



## **8 BIBLIOGRAFÍA**



1. Nedvidkova J, Smitka K, Kopsky V, Hainer V: Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res* 54:133-140, 2005
2. Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL, Garvey WT: Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 55:249-259, 2006
3. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I: Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:29-33, 2004
4. Araki S, Dobashi K, Kubo K, Asayama K, Shirahata A: High molecular weight, rather than total, adiponectin levels better reflect metabolic abnormalities associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 91:5113-5116, 2006
5. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE: Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52:268-276, 2003
6. Ukkola O, Santaniemi M: Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med* 80:696-702, 2002
7. Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, De Matos F, Durand E, Lepretre F, Lecoecur C, Gallina P, Zekiri L, Dina C, Froguel P: 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* 67:1470-1480, 2000
8. Giannessi D, Maltinti M, Del Ry S: Adiponectin circulating levels: a new emerging biomarker of cardiovascular risk. *Pharmacol Res* 56:459-467, 2007
9. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769, 2003
10. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits

- endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102:1296-1301, 2000
11. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y: Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8:731-737, 2002
  12. Carling D: AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie* 87:87-91, 2005
  13. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295, 2002
  14. Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, Garvey WT: Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 18:263-270, 2007
  15. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB: Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16309-16313, 2002
  16. Gil-Campos M, Canete RR, Gil A: Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* 23:963-974, 2004
  17. Fang X, Sweeney G: Mechanisms regulating energy metabolism by adiponectin in obesity and diabetes. *Biochem Soc Trans* 34:798-801, 2006
  18. Bras i Marquillas J: Obesidad en la infancia y adolescencia. *Revista Pediatría de Atención Primaria* 7:209-230, 2005
  19. Bueno Sánchez M: Endocrinología pediátrica en el siglo XXI. El modelo de la obesidad: pasado, presente y futuro. *An Pediatr* 60:26-29, 2004

20. Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Ribas Barba L, Serra Majem L: Epidemiología y factores determinantes de la obesidad infantil y juvenil en España. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 7:13-20, 2005
21. Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Perez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Pena Quintana L: [Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the enKid study (1998-2000)]. *Med Clin (Barc)* 121:725-732, 2003
22. Hu E, Liang P, Spiegelman BM: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-10703, 1996
23. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83, 1999
24. Delporte ML, Brichard SM, Hermans MP, Beguin C, Lambert M: Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58:22-29, 2003
25. Pannacciulli N, Vettor R, Milan G, Granzotto M, Catucci A, Federspil G, De Giacomo P, Giorgino R, De Pergola G: Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1748-1752, 2003
26. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-1935, 2001
27. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G: Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 52:1779-1785, 2003
28. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y: Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50:1126-1133, 2001
29. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM: Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3815-3819, 2001

30. Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K: Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1594-1602, 2003
31. Pender C, Goldfine ID, Tanner CJ, Pories WJ, MacDonald KG, Havel PJ, Houmard JA, Youngren JF: Muscle insulin receptor concentrations in obese patients post bariatric surgery: relationship to hyperinsulinemia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:363-369, 2004
32. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B: Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E527-533, 2003
33. Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B: Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol* 219:9-15, 2004
34. Laviola L, Perrini S, Cignarelli A, Natalicchio A, Leonardini A, De Stefano F, Cuscito M, De Fazio M, Memeo V, Neri V, Cignarelli M, Giorgino R, Giorgino F: Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 55:952-961, 2006
35. Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J, Vidal H: Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47:98-103, 1998
36. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE: Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46:459-469, 2003
37. Gavrilu A, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller LC, Orlova C, Mantzoros CS: Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4823-4831, 2003

38. Statnick MA, Beavers LS, Conner LJ, Corominola H, Johnson D, Hammond CD, Rafaeloff-Phail R, Seng T, Suter TM, Sluka JP, Ravussin E, Gadski RA, Caro JF: Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* 1:81-88, 2000
39. Fisher FM, McTernan PG, Valsamakis G, Chetty R, Harte AL, Anwar AJ, Starcynski J, Crocker J, Barnett AH, McTernan CL, Kumar S: Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res* 34:650-654, 2002
40. Wajchenberg BL: Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21:697-738, 2000
41. Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin RS, Caprio S: Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 350:2362-2374, 2004
42. Valverde AM, Benito M, Lorenzo M: The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. *Acta Physiol Scand* 183:59-73, 2005
43. Stefan N, Stumvoll M, Vozarova B, Weyer C, Funahashi T, Matsuzawa Y, Bogardus C, Tataranni PA: Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans. *Diabetes Care* 26:3315-3319, 2003
44. Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin T, Hayden J, Reaven GM, Reaven PD: Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes* 53:585-590, 2004
45. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1595-1599, 2000
46. Vasseur F, Lepretre F, Lacquemant C, Froguel P: The genetics of adiponectin. *Curr Diab Rep* 3:151-158, 2003
47. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J: Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 360:57-58, 2002

48. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF: Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361:226-228, 2003
49. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108:1875-1881, 2001
50. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, Olefsky JM: The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 51:2968-2974, 2002
51. Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brichard SM: Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 288:1102-1107, 2001
52. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R: Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1084-1089, 2002
53. Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, Rosato FE, Goldstein BJ: Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5662-5667, 2002
54. Association AH: Heart disease and stroke statistics: 2005 update. *Dallas, Tex: American Heart Association*, 2005
55. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277:25863-25866, 2002
56. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106:2767-2770, 2002
57. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Novel

- modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-2476, 1999
58. Kazumi T, Kawaguchi A, Sakai K, Hirano T, Yoshino G: Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure. *Diabetes Care* 25:971-976, 2002
59. Hulthe J, Hulten LM, Fagerberg B: Low adipocyte-derived plasma protein adiponectin concentrations are associated with the metabolic syndrome and small dense low-density lipoprotein particles: atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism* 52:1612-1614, 2003
60. Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Nishikai K, Saruta T: Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)* 103:137-142, 2002
61. Baratta R, Amato S, Degano C, Farina MG, Patane G, Vigneri R, Frittitta L: Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat mass: evidence from both cross-sectional and intervention studies. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2665-2671, 2004
62. Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, LaPoint K, McIntosh M: Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr* 139:1-4, 2009
63. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE: Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 54:1847-1856, 2009
64. Liu H, Liu JY, Wu X, Zhang JT: Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *Int J Biochem Mol Biol* 1:69-89, 2010
65. Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, Kuhajda FP, Hamilton SR: Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 150:201-208, 1997
66. Kusakabe T, Maeda M, Hoshi N, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Suzuki T: Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone-sensitive cells or cells with high

- lipid metabolism and in proliferating fetal cells. *J Histochem Cytochem* 48:613-622, 2000
67. Cooke PS, Naaz A: Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:1127-1135, 2004
68. Fernandez-Real JM, Menendez JA, Moreno-Navarrete JM, Bluher M, Vazquez-Martin A, Vazquez MJ, Ortega F, Dieguez C, Fruhbeck G, Ricart W, Vidal-Puig A: Extracellular fatty acid synthase: a possible surrogate biomarker of insulin resistance. *Diabetes* 59:1506-1511, 2010
69. Wang Y, Kuhajda FP, Sokoll LJ, Chan DW: Two-site ELISA for the quantitative determination of fatty acid synthase. *Clin Chim Acta* 304:107-115, 2001
70. Wang YY, Kuhajda FP, Cheng P, Chee WY, Li T, Helzlsouer KJ, Sokoll LJ, Chan DW: A new model ELISA, based on two monoclonal antibodies, for quantification of fatty acid synthase. *J Immunoassay Immunochem* 23:279-292, 2002
71. Wang YY, Kuhajda FP, Li J, Finch TT, Cheng P, Koh C, Li T, Sokoll LJ, Chan DW: Fatty acid synthase as a tumor marker: its extracellular expression in human breast cancer. *J Exp Ther Oncol* 4:101-110, 2004
72. Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Fernandez-Real JM, Menendez JA: AMPK-sensed cellular energy state regulates the release of extracellular Fatty Acid Synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 378:488-493, 2009
73. Mayas MD, Ortega FJ, Gomez-Huelgas R, Roca N, Fernandez-Real JM, Tinahones FJ: Decrease in FASN expression in adipose tissue of hypertensive individuals. *Am J Hypertens* 22:1258-1262, 2009
74. Mayas MD, Ortega FJ, Macias-Gonzalez M, Bernal R, Gomez-Huelgas R, Fernandez-Real JM, Tinahones FJ: Inverse relation between FASN expression in human adipose tissue and the insulin resistance level. *Nutr Metab (Lond)* 7:3, 2010
75. Koh H, Chung J: AMPK links energy status to cell structure and mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* 362:789-792, 2007
76. Kuhajda FP: AMP-activated protein kinase and human cancer: cancer metabolism revisited. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 4:S36-41, 2008
77. Williams T, Brenman JE: LKB1 and AMPK in cell polarity and division. *Trends Cell Biol* 18:193-198, 2008

78. Brunet J, Vazquez-Martin A, Colomer R, Grana-Suarez B, Martin-Castillo B, Menendez JA: BRCA1 and acetyl-CoA carboxylase: the metabolic syndrome of breast cancer. *Mol Carcinog* 47:157-163, 2008
79. Demers LM: Thyroid disease: pathophysiology and diagnosis. *Clin Lab Med* 24:19-28, 2004
80. Lydiatt DD, Bucher GS: Historical vignettes of the thyroid gland. *Clin Anat* 24:1-9, 2011
81. Yamada T, Tsukui T, Ikejiri K, Yukimura Y, Kotani M: Volume of sella turcica in normal subjects and in patients with primary hypothyroidism and hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 42:817-822, 1976
82. Gallistl S, Sudi KM, Leschnik B, Muntean W, Borkenstein MH: Inverse correlation between thyroid function and hemostatic markers for coronary heart disease in obese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13:1615-1620, 2000
83. King LR, Portnoy RM, Goldsmith RE: Serum Calcium Homeostasis Following Thyroid Surgery As Measured By Ethylenediamine Tetra-Acetate Infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 25:577-584, 1965
84. Kester MH, Martinez de Mena R, Obregon MJ, Marinkovic D, Howatson A, Visser TJ, Hume R, Morreale de Escobar G: Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3117-3128, 2004
85. Weintraub BD, Wondisford FE, Farr EA, Steinfeldt HJ, Radovick S, Gesundheit N, Gyves PW, Taylor T, DeCherney GS: Pre-translational and post-translational regulation of TSH synthesis in normal and neoplastic thyrotrophs. *Horm Res* 32:22-24, 1989
86. Wilber JF, Utiger RD: The effect of glucocorticoids on thyrotropin secretion. *J Clin Invest* 48:2096-2103, 1969
87. Dussault JH: The effect of dexamethasone on TSH and prolactin secretion after TRH stimulation. *Can Med Assoc J* 111:1195-1197, 1974
88. Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C: Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev* 72:667-697, 1992
89. Refetoff S: Resistance to thyrotropin. *J Endocrinol Invest* 26:770-779, 2003

90. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR: Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38-89, 2002
91. Leonard J, Visser T: Biochemistry of deiodination. *Thyroid hormone metabolism*, 1986
92. Nussey S, Whitehead S: An Integrated Approach *Endocrinology*, 2001
93. Jansen J, Friesema EC, Milici C, Visser TJ: Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* 15:757-768, 2005
94. Mendel CM, Weisiger RA, Jones AL, Cavalieri RR: Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study. *Endocrinology* 120:1742-1749, 1987
95. Kim B: Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid* 18:141-144, 2008
96. Douyon L, Schteingart DE: Effect of obesity and starvation on thyroid hormone, growth hormone, and cortisol secretion. *Endocrinol Metab Clin North Am* 31:173-189, 2002
97. Krotkiewski M: Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* 440:85-98, 2002
98. al-Adsani H, Hoffer LJ, Silva JE: Resting energy expenditure is sensitive to small dose changes in patients on chronic thyroid hormone replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1118-1125, 1997
99. Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen LB, Bulow I, Perrild H, Ovesen L, Jorgensen T: Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4019-4024, 2005
100. Kim BJ, Kim TY, Koh JM, Kim HK, Park JY, Lee KU, Shong YK, Kim WB: Relationship between serum free T4 (FT4) levels and metabolic syndrome (MS) and its components in healthy euthyroid subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 70:152-160, 2009
101. Aragao CN, Souza LL, Cabanelas A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC: Effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on serum adiponectin. *Metabolism* 56:6-11, 2007

102. Fujimoto N, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yamaguchi K, Saikawa T, Yoshimatsu H, Yoshioka H: Adiponectin is expressed in the brown adipose tissue and surrounding immature tissues in mouse embryos. *Biochim Biophys Acta* 1731:1-12, 2005
103. Iglesias P, Alvarez Fidalgo P, Codoceo R, Diez JJ: Serum concentrations of adipocytokines in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism before and after control of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59:621-629, 2003
104. Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai K, Tamemoto H, Kawakami M, Ishikawa SE: Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism* 54:1461-1466, 2005
105. Yaturu S, Prado S, Grimes SR: Changes in adipocyte hormones leptin, resistin, and adiponectin in thyroid dysfunction. *J Cell Biochem* 93:491-496, 2004
106. Takeda S, Karsenty G: Central control of bone formation. *J Bone Miner Metab* 19:195-198, 2001
107. Gehron-Robey P: Principles of Bone Biology. *Academic Press, San Diego, CA*:155-166, 1996
108. Kjaer M: Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84:649-698, 2004
109. Tong W, Glimcher MJ, Katz JL, Kuhn L, Eppell SJ: Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy. *Calcif Tissue Int* 72:592-598, 2003
110. Karsenty G, de Crombrughe B: Two different negative and one positive regulatory factors interact with a short promoter segment of the alpha 1 (I) collagen gene. *J Biol Chem* 265:9934-9942, 1990
111. Nehls MC, Rippe RA, Veloz L, Brenner DA: Transcription factors nuclear factor I and Sp1 interact with the murine collagen alpha 1 (I) promoter. *Mol Cell Biol* 11:4065-4073, 1991
112. Karsenty G, de Crombrughe B: Conservation of binding sites for regulatory factors in the coordinately expressed alpha 1 (I) and alpha 2 (I) collagen promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 177:538-544, 1991

113. Greenwel P, Inagaki Y, Hu W, Walsh M, Ramirez F: Sp1 is required for the early response of alpha2(I) collagen to transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem* 272:19738-19745, 1997
114. Sandberg M, Autio-Harminen H, Vuorio E: Localization of the expression of types I, III, and IV collagen, TGF-beta 1 and c-fos genes in developing human calvarial bones. *Dev Biol* 130:324-334, 1988
115. Harada S, Rodan GA: Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423:349-355, 2003
116. Tanko LB, Mouritzen U, Lehmann HJ, Warming L, Moelgaard A, Christgau S, Qvist P, Baumann M, Wiczorek L, Hoyle N, Christiansen C: Oral ibandronate: changes in markers of bone turnover during adequately dosed continuous and weekly therapy and during different suboptimally dosed treatment regimens. *Bone* 32:687-693, 2003
117. Obrant KJ, Kakonen SM, Astermark J, Lilja H, Lovgren T, Akesson K, Pettersson K: The proportion of carboxylated to total or intact osteocalcin in serum discriminates warfarin-treated patients from control subjects. *J Bone Miner Res* 14:555-560, 1999
118. Gorai I, Hosoda K, Chaki O, Taguchi Y, Nakayama M, Yoh K, Yamaji T, Minaguchi H: A heterogeneity in serum osteocalcin N-terminal fragments in Paget's disease: a comparison with other biochemical indices in pre- and postmenopause. *Calcif Tissue Int* 63:459-465, 1998
119. Lee AJ, Hodges S, Eastell R: Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 37 ( Pt 4):432-446, 2000
120. Gerdhem P, Isaksson A, Akesson K, Obrant KJ: Increased bone density and decreased bone turnover, but no evident alteration of fracture susceptibility in elderly women with diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 16:1506-1512, 2005
121. Wolf G: Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev* 54:332-333, 1996
122. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G:

- Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130:456-469, 2007
123. Okazaki R, Totsuka Y, Hamano K, Ajima M, Miura M, Hirota Y, Hata K, Fukumoto S, Matsumoto T: Metabolic improvement of poorly controlled noninsulin-dependent diabetes mellitus decreases bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2915-2920, 1997
124. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S, Sugimoto T: Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 94:45-49, 2009
125. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B: Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 94:827-832, 2009
126. Fernandez-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, Gorostiaga E, Gomez-Ambrosi J, Moreno-Navarrete JM, Fruhbeck G, Martinez C, Idoate F, Salvador J, Forga L, Ricart W, Ibanez J: The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab* 94:237-245, 2009
127. Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, Liao EY: Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 21:1648-1656, 2006
128. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P: Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5266-5270, 2008
129. Williams GA, Wang Y, Callon KE, Watson M, Lin JM, Lam JB, Costa JL, Orpe A, Broom N, Naot D, Reid IR, Cornish J: In vitro and in vivo effects of adiponectin on bone. *Endocrinology* 150:3603-3610, 2009
130. Sakamoto N, Nishiike T, Iguchi H, Sakamoto K: Relationship between acute insulin response and vitamin K intake in healthy young male volunteers. *Diabetes Nutr Metab* 12:37-41, 1999

131. DeLaurier A, Jackson B, Ingham K, Pfeiffer D, Horton MA, Price JS: Biochemical markers of bone turnover in the domestic cat: relationships with age and feline osteoclastic resorptive lesions. *J Nutr* 132:1742S-1744S, 2002
132. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM: Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 17:333-368, 1996
133. Crofton PM: Biochemistry of alkaline phosphatase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 16:161-194, 1982
134. Price CP: Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantitation. *Ann Clin Biochem* 30 ( Pt 4):355-372, 1993
135. Everts V, Delaisse JM, Korper W, Beertsen W: Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone. *J Bone Miner Res* 13:1420-1430, 1998
136. van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Lowik CW: Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 199:805-814, 2004
137. Ross FP, Christiano AM: Nothing but skin and bone. *J Clin Invest* 116:1140-1149, 2006
138. Bjoerm H, Christian E, Feld M, Zichner L, A K: Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cement less total hip replacement. *Acta Orthopaedic* 78:221-225, 2007
139. Scariano JK, Garry PJ, Montoya GD, Wilson JM, Baumgartner RN: Critical differences in the serial measurement of three biochemical markers of bone turnover in the sera of pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem* 34:639-644, 2001
140. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K: Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 14:561-566, 2003
141. Oshima K, Nampei A, Matsuda M, Iwaki M, Fukuhara A, Hashimoto J, Yoshikawa H, Shimomura I: Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* 331:520-526, 2005

142. Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, Xie H, Zhou HD, Wu XP, Liao EY: Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* 309:99-109, 2005
143. Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kubota N, Yamauchi T, Terauchi Y, Kadowaki T, Takeuchi Y, Fukumoto S, Ikeda T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H: Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem* 99:196-208, 2006
144. Marshall WA, Tanner JM: Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 44:291-303, 1969
145. Marshall WA, Tanner JM: Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45:13-23, 1970
146. Carrascosa-Lezcano A, Fernández-García JM, Ferrández-Longás A, López-Siguero JP, E S-G: Cross-sectional study of growth and development. ed. 1st. *Barcelona, Spain.: PFIZER, S.A*, 2008
147. Treuth MS, Butte NF, Wong WW, Ellis KJ: Body composition in prepubertal girls: comparison of six methods. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1352-1359, 2001
148. Majema LS, Ribas Barbab L, Aranceta Bartrinac J, Pérez Rodrigoc C, Saavedra Santanad P, Peña Quintanaa L: Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000). *Med Clin (Barc)* 121:725-732, 2003
149. Ferrozzi F, Zuccoli G, Tognini G, Castriota-Scanderbeg A, Bacchini E, Bernasconi S, Campani R: [An assessment of abdominal fatty tissue distribution in obese children. A comparison between echography and computed tomography]. *Radiol Med* 98:490-494, 1999
150. Hirooka M, Kumagi T, Kurose K, Nakanishi S, Michitaka K, Matsuura B, Horiike N, Onji M: A technique for the measurement of visceral fat by ultrasonography: comparison of measurements by ultrasonography and computed tomography. *Intern Med* 44:794-799, 2005
151. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419, 1985

152. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Castro A, Casamitjana R, Ricart W: Thyroid function is intrinsically linked to insulin sensitivity and endothelium-dependent vasodilation in healthy euthyroid subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3337-3343, 2006
153. Roos A, Bakker SJ, Links TP, Gans RO, Wolffenbuttel BH: Thyroid function is associated with components of the metabolic syndrome in euthyroid subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92:491-496, 2007
154. Boekholdt SM, Titan SM, Wiersinga WM, Chatterjee K, Basart DC, Luben R, Wareham NJ, Khaw KT: Initial thyroid status and cardiovascular risk factors: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 72:404-410, 2010
155. Asvold BO, Bjoro T, Nilsen TI, Gunnell D, Vatten LJ: Thyrotropin levels and risk of fatal coronary heart disease: the HUNT study. *Arch Intern Med* 168:855-860, 2008
156. Jameson J: Mechanisms of thyroid hormone action. *DeGroot LJ, Jameson JL, eds. Endocrinology, ed. 4th, vol. 2 Philadelphia: WB Saunders:1327-1344, 2001*
157. Fukuyama K, Ichiki T, Imayama I, Ohtsubo H, Ono H, Hashiguchi Y, Takeshita A, Sunagawa K: Thyroid hormone inhibits vascular remodeling through suppression of cAMP response element binding protein activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2049-2055, 2006
158. Berenson GS: Childhood risk factors predict adult risk associated with subclinical cardiovascular disease. The Bogalusa Heart Study. *Am J Cardiol* 90:3L-7L, 2002
159. Sabio G, Cavanagh-Kyros J, Barrett T, Jung DY, Ko HJ, Ong H, Morel C, Mora A, Reilly J, Kim JK, Davis RJ: Role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. *Genes Dev* 24:256-264, 2010
160. Skarulis MC, Celi FS, Mueller E, Zemsanova M, Malek R, Hugendubler L, Cochran C, Solomon J, Chen C, Gorden P: Thyroid hormone induced brown adipose tissue and amelioration of diabetes in a patient with extreme insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 95:256-262, 2010
161. Lopez M, Varela L, Vazquez MJ, Rodriguez-Cuenca S, Gonzalez CR, Velagapudi VR, Morgan DA, Schoenmakers E, Agassandian K, Lage R, Martinez de Morentin PB, Tovar S, Nogueiras R, Carling D, Lelliott C, Gallego R, Oresic M, Chatterjee K, Saha

- AK, Rahmouni K, Dieguez C, Vidal-Puig A: Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 16:1001-1008, 2010
162. Walsh JP, Bremner AP, Bulsara MK, O'Leary P, Leedman PJ, Feddema P, Michelangeli V: Subclinical thyroid dysfunction as a risk factor for cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 165:2467-2472, 2005
163. Cappola AR, Fried LP, Arnold AM, Danese MD, Kuller LH, Burke GL, Tracy RP, Ladenson PW: Thyroid status, cardiovascular risk, and mortality in older adults. *Jama* 295:1033-1041, 2006
164. Ochs N, Auer R, Bauer DC, Nanchen D, Gusekloo J, Cornuz J, Rodondi N: Meta-analysis: subclinical thyroid dysfunction and the risk for coronary heart disease and mortality. *Ann Intern Med* 148:832-845, 2008
165. Razvi S, Shakoor A, Vanderpump M, Weaver JU, Pearce SH: The influence of age on the relationship between subclinical hypothyroidism and ischemic heart disease: a metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2998-3007, 2008
166. Singh S, Duggal J, Molnar J, Maldonado F, Barsano CP, Arora R: Impact of subclinical thyroid disorders on coronary heart disease, cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis. *Int J Cardiol* 125:41-48, 2008
167. Richards JB, Valdes AM, Burling K, Perks UC, Spector TD: Serum adiponectin and bone mineral density in women. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1517-1523, 2007
168. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Mellstrom D: Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 24:785-791, 2009
169. Shea MK, Gundberg CM, Meigs JB, Dallal GE, Saltzman E, Yoshida M, Jacques PF, Booth SL: Gamma-carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. *Am J Clin Nutr* 90:1230-1235, 2009
170. Blum M, Harris SS, Must A, Phillips SM, Rand WM, Dawson-Hughes B: Weight and body mass index at menarche are associated with premenopausal bone mass. *Osteoporos Int* 12:588-594, 2001
171. Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE: Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 35:842-849, 2004

172. Pi M, Chen L, Huang MZ, Zhu W, Ringhofer B, Luo J, Christenson L, Li B, Zhang J, Jackson PD, Faber P, Brunden KR, Harrington JJ, Quarles LD: GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS One* 3:e3858, 2008
173. Kasai T, Bandow K, Suzuki H, Chiba N, Kakimoto K, Ohnishi T, Kawamoto S, Nagaoka E, Matsuguchi T: Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity. *J Cell Physiol* 221:740-749, 2009
174. Elbaz A, Wu X, Rivas D, Gimble JM, Duque G: Inhibition of fatty acid biosynthesis prevents adipocyte lipotoxicity on human osteoblasts in vitro. *J Cell Mol Med* 14:982-991, 2010
175. Watkins BA, Li Y, Lippman HE, Feng S: Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68:387-398, 2003
176. Oh SR, Sul OJ, Kim YY, Kim HJ, Yu R, Suh JH, Choi HS: Saturated fatty acids enhance osteoclast survival. *J Lipid Res*, 2009
177. Prats-Puig A, Mas-Parareda M, Riera-Perez E, Gonzalez-Forcadell D, Mier C, Mallol-Guisset M, Diaz M, Bassols J, de Zegher F, Ibanez L, Lopez-Bermejo A: Carboxylation of osteocalcin affects its association with metabolic parameters in healthy children. *Diabetes Care* 33:661-663, 2010
178. Qiao S, Tuohimaa P: Vitamin D3 inhibits fatty acid synthase expression by stimulating the expression of long-chain fatty-acid-CoA ligase 3 in prostate cancer cells. *FEBS Lett* 577:451-454, 2004